



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE LEVODOPA
SOBRE LA NEUROLOGÍA Y DESEMPEÑO
COGNITIVO DE 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:

MARÍA FERNANDA LÓPEZ GUTIÉRREZ



DIRECTORA DE TESIS:

Q.F.B. PERLA DEL ROCÍO MORENO CASTILLA

CIUDAD UNIVERSITARIA, CIUDAD DE MÉXICO

2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

1. Datos del alumno

López

Gutiérrez

María Fernanda

5558081773

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

305786607

2. Datos del tutor

QFB

Perla del Rocío

Moreno

Castilla

3. Datos del sinodal 1

Dra

Ana Brígida Clorinda

Arias Alvarez

4. Datos del sinodal 2

Dra

Gohar

Gevorgyan

5. Datos del sinodal 3

Dra

Martha Lilia

Escobar Rodríguez

6. Datos del sinodal 4

Dr

Francisco Xavier

Sotres

Bayón

7. Datos del trabajo escrito

Efecto de la administración de levodopa sobre la neuropatología y desempeño cognitivo de un modelo transgénico para la enfermedad de Alzheimer

82 p

2016

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Neurobiología del aprendizaje y la memoria, de la División de Neurociencias del Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México. Apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) CB 250870, y por el Programa de Apoyos a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT-UNAM) IN209413 y IN208616.

Agradecimientos

Quiero agradecerle al Dr. Federico Bermúdez por haberme abierto las puertas a su laboratorio y permitirme formar parte de su equipo como Ayudante de Investigador del Sistema Nacional de Investigadores (SNI) nivel III.

Le doy gracias a Perla Moreno, mi tutora y directora de tesis, por introducirme al mundo de la investigación científica, por su amigable guía y apoyo constante de principio a fin. A las técnicas académicas Dra. Israela Balderas y Dra. Leticia Ramírez por sus clases y apoyo durante el tiempo en que se realizó el proyecto.

A los sinodales, la Dra. Clorinda Arias, la Dra. Gohar Gevorgyan, la Dra. Martha Escobar, y el Dr. Francisco Sotres, por su sabia revisión y valiosa aportación al trabajo.

A la Dra. Claudia Rivera y al personal del *vivarium*, al Dr. Fernando García y al equipo de microscopía, la Dra. Laura Ongay y a las personas en Biología Molecular, y a Ana María Escalante y el equipo de Cómputo, por la ayuda técnica y facilitación de sus instalaciones en el Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

Gracias a Gerardo Ramírez, Elvi Gil, Daniel Ávila, Alejandro Bárcenas, María Romero, David Vallejo, Gianfranco Chávez, Lucía Landa, Analí Díaz, y Rodrigo Pérez, por su amistad y por las buenas memorias que formamos en el laboratorio BL-201.

A mis amigos de toda la vida y a mi familia, porque siempre he podido contar con su apoyo y sin ellos este trabajo no hubiera sido posible.

Abreviaturas

β A	Beta amiloide
APP	Proteína precursora amiloide (Amyloid Precursor Protein)
CA1	Cuerno de Amón 1
CA3	Cuerno de Amón 3
CI	Corteza insular
COMT	Catecol- <i>O</i> -metiltransferasa.
DAB	Diaminobencidina
EA	Enfermedad de Alzheimer
GABA	Ácido γ -aminobutírico
IE	Índice de exploración
LTD	Depresión a largo plazo (Long-Term Depression)
LTP	Potenciación a largo plazo (Long Term Potentiation)
MAO-B	Monoamino-oxidasa B
MAPT	Proteína tau asociada a microtúbulo (Microtubule Associated Protein Tau)
MLP	Memoria de largo plazo
MWM	Laberinto acuático de Morris (Morris Water Maze)
OLM	Memoria de ubicación de objetos (Object Location Memory)
ORM	Memoria de reconocimiento de objetos (Object Recognition Memory)
PHFs	Filamentos helicoidales pareados de p-tau hiperfosforilada
PSEN1	Presenilina 1
TH	Tirosina hidroxilasa
TTE	Tiempo total de exploración

Contenido

1	Introducción.....	3
1.1	Enfermedad de Alzheimer	3
	Características clínicas de la enfermedad de Alzheimer	3
	El aprendizaje y la memoria en la EA	4
	Características histopatológicas	5
	Bases genéticas del Alzheimer	10
1.2	Tratamientos para la Enfermedad de Alzheimer	11
	Tratamientos sintomáticos	12
	Tratamientos de progresión	12
1.3	Modelos animales para la Enfermedad de Alzheimer	13
	Modelos transgénicos	13
2	Antecedentes.....	15
2.1	Alteraciones sinápticas y neuroquímicas en la EA.....	15
2.2	La enfermedad de Alzheimer y el sistema dopaminérgico	16
	La función dopaminérgica se encuentra alterada en la EA.....	16
	El sistema dopaminérgico tiene relevancia en procesos cognitivos.....	17
	La neuropatología en modelos animales altera la actividad dopaminérgica.....	17
3	Planteamiento del Problema.....	22
3.1	Hipótesis	23
3.2	Objetivo general	23
3.3	Objetivos particulares.....	23
3.4	Diseño experimental.....	23
4	Metodología experimental	25
4.1	Sujetos	25
	Ratón 3xTg-AD	25
4.2	Administración de Levodopa	26
4.3	Análisis de neurotransmisores	27
	Implantación de cánula para microdiálisis.....	27
	Microdiálisis en libre movimiento	28
	Derivatización química.....	30
	Electroforesis capilar acoplada a fluorescencia inducida por láser (EC-FIL).....	30
4.4	Memoria de Reconocimiento de Objetos (ORM)	31
	Equipo y objetos	32
	Protocolo Conductual	32
4.5	Memoria de localización de objetos (OLM).....	34
	Protocolo Conductual	34
4.6	Laberinto acuático de Morris (MWM).....	35
	Equipo 36	
	Entrenamiento y Protocolo	36
4.7	Cuantificación del β A	37
	Sacrificio y análisis de tejido cerebral.....	37
	Inmunofluorescencia	38
	Inmunohistoquímica de DAB	38
	Procesamiento de imágenes	39
	Genotipificación	40
4.8	Análisis estadístico	40

5	Resultados	42
5.1	Efecto del tratamiento con levodopa en los niveles de dopamina en CI durante la prueba de ORM	42
5.2	Efecto del tratamiento con levodopa sobre la memoria de reconocimiento en el modelo 3xTg-AD.....	43
5.3	Efecto del tratamiento con levodopa en la ejecución conductual de la memoria espacial en el ratón 3xTg-AD	45
	Memoria de ubicación de objetos (OLM)	45
	Laberinto acuático de Morris (MWM)	46
5.4	Efecto del tratamiento con levodopa sobre la acumulación del β A.....	48
6	Discusión	52
6.1	Efecto de la administración levodopa sobre los niveles de dopamina y la memoria de reconocimiento	52
6.2	El tratamiento con levodopa en la memoria espacial	54
6.3	El tratamiento con levodopa sobre la acumulación de β A en el ratón 3xTg-AD	56
6.4	Perspectivas	60
7	Conclusiones	62
8	Referencias	64

Resumen

La Enfermedad de Alzheimer (EA) es un padecimiento neurodegenerativo cuya principal característica es la pérdida progresiva de la memoria y de varias funciones cognitivas. Su sintomatología clínica se asocia a la acumulación del péptido beta amiloide (β A) y a la acumulación de marañas neurofibrilares de proteína tau hiperfosforilada en tejido cerebral. Diversos estudios han encontrado que estos marcadores histopatológicos alteran el funcionamiento neuronal. Se ha reportado que en la EA se producen alteraciones en la neurotransmisión colinérgica y glutamatérgica del cerebro que repercuten en el aprendizaje y formación de memorias. Si bien se han desarrollado tratamientos para compensar la disfunción de estos sistemas de neurotransmisión, no han sido suficientes para aminorar los síntomas y progresión de la enfermedad, por lo que resulta necesario investigar otros blancos terapéuticos. La relación entre la EA y el sistema dopaminérgico ha sido poco explorada, y se ha encontrado que este sistema, que es modulador de procesos de aprendizaje y memoria, está alterado tanto en pacientes como en modelos experimentales para la EA. Dado lo anterior, resulta necesario investigar la relación de este sistema con la EA, lo cual permitirá el desarrollo de alternativas terapéuticas que aminoren los síntomas cognitivos y progresión de este padecimiento.

El presente trabajo investiga el efecto del tratamiento sub-agudo con levodopa sobre el desempeño cognitivo y la acumulación de β -amiloide en el modelo 3xTg-AD. Hallamos que el tratamiento con levodopa incrementó los niveles de dopamina y restauró la memoria de reconocimiento del ratón 3xTg-AD. También se observó una disminución de la acumulación del β A intraneuronal en hipocampo y la corteza insular, regiones cerebrales relevantes en los procesos de memoria. Los resultados que se obtuvieron apoyan la relevancia del sistema dopaminérgico como un factor participante en el desarrollo de la patología de la EA y develan su potencial terapéutico para el tratamiento de la EA.

1 Introducción

1.1 Enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un padecimiento neurodegenerativo cuya principal característica es la pérdida progresiva de la memoria y de varias funciones cognitivas en los pacientes que la padecen. Actualmente es considerada como la forma más común de demencia en adultos mayores, y conforme la población alrededor del mundo envejece, esta enfermedad destaca como un problema para la salud pública (Tom et al., 2015). A pesar que la enfermedad se describió por primera vez en 1906 por Alois Alzheimer, no existe una cura o tratamiento efectivo, dado que no se conoce su etiología y es un padecimiento complejo cuyas causas y procesos patológicos se han ido develando con los años de investigación.

Características clínicas de la enfermedad de Alzheimer

La EA se puede definir como una enfermedad crónica que comienza con un proceso fisiopatológico subclínico, el cual se manifiesta con alteraciones en la memoria y es seguido de un declive cognitivo cuyo transcurso puede variar de un año a dos décadas. Este declive llega al grado en que los pacientes requieren ayuda constante en la realización de actividades cotidianas y culmina en la demencia, considerada la etapa final de este padecimiento (Sisodia y Tanzi, 2007). El estudio del progreso de los problemas cognitivos en los pacientes, así como el análisis del cerebro por tomografías por emisión de positrones (PET), se han utilizado como un medio de diagnóstico para la EA con un valor predictivo confiable (Kantarci, 2014; Sisodia y Tanzi, 2007). No obstante, el diagnóstico definitivo de la enfermedad es a través de un análisis *post mortem* de los marcadores histopatológicos en tejido cerebral, que son la acumulación de dos proteínas: el péptido beta amiloide (β A) y la proteína tau hiperfosforilada (Wurtman, 2015). Los pacientes generalmente mueren por complicaciones relacionadas con la EA que los hace susceptibles a contraer infecciones. Frecuentemente, la eventual dificultad que tienen para deglutir propicia el desarrollo de neumonía, una causa de muerte común en personas con demencia (Chouinard, 2000; Foley et al., 2015).

El aprendizaje y la memoria en la EA

La incapacidad que tienen los pacientes de recordar adecuadamente tiene efectos devastadores en su calidad de vida y en la de las personas que los rodean. Estos problemas cognitivos están relacionados principalmente con el procesamiento de la memoria (Sperling et al., 2010). La memoria, que se ha definido como la adquisición, almacenamiento y recuperación de información, engloba todos los cambios conductuales que se basan en experiencias previas (Reilly, M. Kim, 2013).

La presentación de comportamientos complejos y el almacenamiento de memorias dependen de las sinapsis, que son la unidad funcional del cerebro: establecen la comunicación neuronal y constituyen los circuitos neuronales por los cuales hay flujo de información (Mayford, Siegelbaum, y Kandel, 2012). Los circuitos cerebrales que procesan la memoria dependen principalmente del sistema del lóbulo temporal medial. Este sistema comprende de estructuras como el hipocampo, la amígdala, y las cortezas parahipocampal, entorrinal y perirrinal (Squire y Zola-Morgan, 1991). Desde el siglo pasado se había propuesto que el mecanismo que utiliza el cerebro para almacenar grandes cantidades de información yace en modificaciones entre conexiones sinápticas (Whitlock et al., 2006). Hace más de 40 años, en el hipocampo de conejo se descubrió el fenómeno conocido como LTP (Long Term Potentiation: potenciación a largo plazo) (Bliss y Lomo, 1973). La LTP es producto de una estimulación sináptica de alta frecuencia que resulta en un fortalecimiento o facilitación de la comunicación neuronal a largo plazo. Por el contrario, una estimulación sináptica de baja frecuencia resulta en un debilitamiento de la sinapsis a largo plazo, siendo este fenómeno llamado LTD (Lisman, 2007). En humanos se han utilizado técnicas no invasivas para la detección de fenómenos tipo LTP/LTD que se han asociado a mecanismos plásticos (Forsyth et al., 2015; Thickbroom, 2007). Se ha demostrado que tanto LTP como LTD son procesos asociados con el aprendizaje y la memoria en ratones (Rodrigues et al., 2004; Whitlock et al., 2006). La estimulación eléctrica, así como eventos de aprendizaje, evocan LTP que induce una rápida transcripción transitoria de genes tempranos inmediatos. La expresión de estos genes activan cascadas moleculares que se encargan de la consolidación de la memoria (Laeremans et al., 2015). Es así como se ha encontrado que es posible la manipulación de memorias en ratones a través de la inducción artificial de LTP y LTD (Sadegh Nabavi et al., 2014).

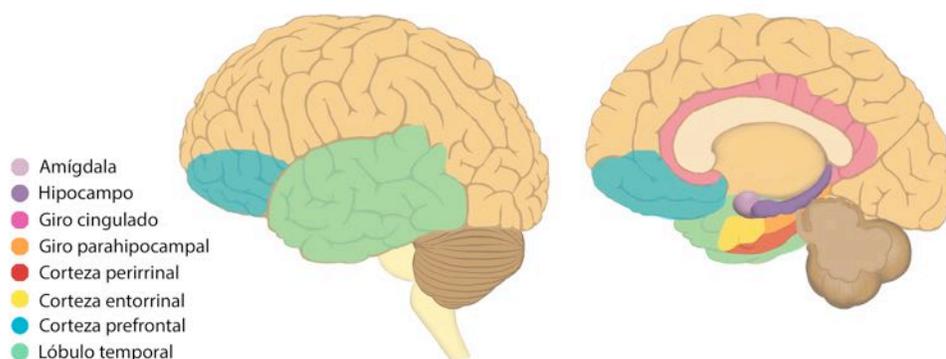


Figura 1.1 Regiones del cerebro humano. Representación de regiones relevantes para el procesamiento de la memoria.

El conocimiento sobre la fisiología de la sinapsis y la plasticidad sináptica ha conducido a trabajos que estudian estos mismos procesos en condiciones sujetas a patologías tipo EA. En pacientes con la EA, se ha observado que la pérdida de marcadores sinápticos es un parámetro predictivo que correlaciona con los síntomas clínicos y progresión de la enfermedad (Dickson et al., 1995; Sze et al., 1997), y se ha reportado que la plasticidad cortical tipo LTP se encuentra severamente afectada (Koch et al., 2011). Uno de los primeros síntomas observados en la EA es la pérdida de memoria episódica a corto plazo, asociada a problemas con orientación espacial y atención (Snowden et al., 2011). La memoria episódica es la capacidad de recordar experiencias previas (Tulving, 2002), y se procesa principalmente en el hipocampo. Otro tipo de memoria alterada en etapas tempranas es la memoria de reconocimiento (ORM por sus siglas en inglés), que es la capacidad de identificar un elemento como previamente encontrado (Clark y Martin, 2005) y se codifica en la corteza perirrinal y otras regiones del lóbulo temporal (Haase et al., 2013).

El papel central que tiene la disfunción cognitiva en los pacientes con la EA ha generado muchas preguntas respecto a cuáles son los mecanismos patológicos que están alterando el funcionamiento neuronal adecuado. Los marcadores neuropatológicos que se han encontrado en los cerebros de los pacientes han demostrado ser un factor importante en el desarrollo de las alteraciones cognitivas (D. Selkoe, 2002; Shankar et al., 2008).

Características histopatológicas

La neuropatología clásica de la Enfermedad de Alzheimer consiste en la acumulación de la proteína beta amiloide (βA), un péptido de 40-42 residuos, y la fosforilación de la proteína asociadas a microtúbulos tau que forma marañas neurofibrilares (D. J. Selkoe, 2001a).

Péptido β -amiloide

La producción del β A es un ejemplo de un mecanismo fisiológico conocido como proteólisis intramembranal regulada. En este mecanismo, las proteínas de una membrana llevan a cabo una liberación regulada de sus dominios exteriores a través de proteasas ancladas en la membrana, conocidas como secretasas (Haass y Selkoe, 2007). En condiciones fisiológicas, el β A se produce en el cerebro de forma natural a muy baja concentración. Se sabe que participa como un regulador de la homeostasis sináptica, y tiene una producción y degradación controladas (Kamenetz et al., 2003). No obstante, en la EA su función y procesamiento se encuentran alterados. El β A es un péptido que es producto de la proteólisis de la proteína precursora amiloide (APP: *amyloid precursor protein*), una proteína transmembranal cuya función fisiológica no se ha determinado totalmente, pero se sabe que en el cerebro participa en la sinaptogénesis (Chan et al., 2002). El metabolismo de las principales isoformas de la APP involucra la actividad de tres secretasas: α , β y γ ; y puede llevarse a cabo por dos vías: la vía amiloidogénica y la no amiloidogénica. En la vía no amiloidogénica, α -secretasa corta dentro de la secuencia β A 1-42, produciendo la forma soluble sAPP α y previniendo la generación del β A (Figura 1.2, A). La vía amiloidogénica ocurre vía el corte por la β -secretasa (BACE1) y γ -secretasa, la cual corta en cualquier otro sitio de APP y deja el fragmento del β A intacto, permitiendo la generación del péptido β A 1-42 (D. J. Selkoe, 2001b; Sisodia y Tanzi, 2007)(Figura 1.2, B).

Cuando el procesamiento de la APP se lleva a cabo por la vía amiloidogénica, hay una generación de β A en el endosoma al interior de la célula (Baranello et al., 2015). En las neuronas, gran parte del β A generado en este compartimento celular es degradado por proteasas, que son enzimas degradadoras de proteínas (Baranello et al., 2015). El β A que no es eliminado por esta vía, puede ser transportado al lisosoma para su degradación, o podría ser transportado en vesículas recicladoras hacia la superficie celular (Rajendran et al., 2006). La degradación eficiente del β A a través de estos sistemas es crucial para evitar su acumulación. En el caso de la EA, los principales sistemas de degradación de proteínas constitutivos presentan una falla generalizada (Baranello et al., 2015).

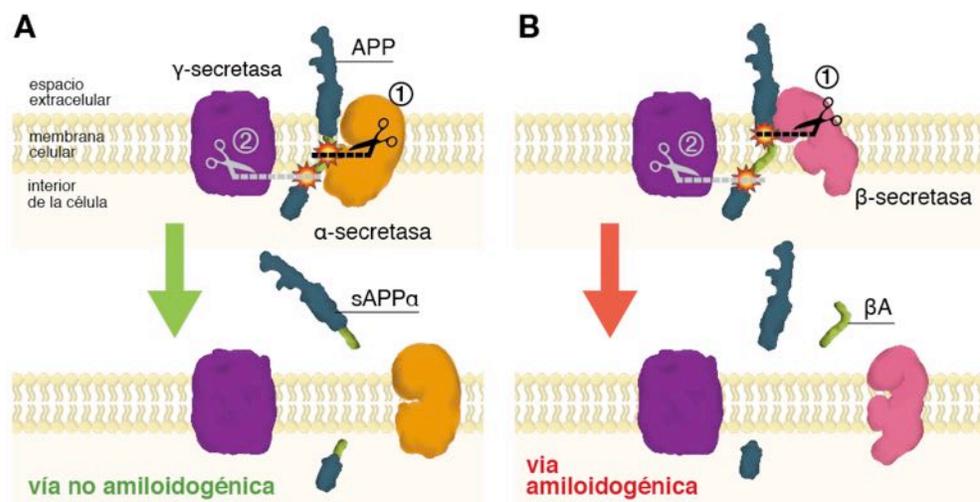


Figura 1.2 Representación del procesamiento de APP. A: En la vía no amiloidogénica, α -secretasa corta APP para formar sAPP α . B: En la vía amiloidogénica, β -secretasa corta en lugar de α -secretasa y en un sitio distinto, seguido del corte de γ -secretasa que resulta en la formación del péptido β A.

La liberación del β A podría ocurrir potencialmente en cualquier lugar en que se localicen la APP y β y γ -secretasa (LaFerla et al., 2007). El β A se produce predominantemente en la membrana plasmática (LaFerla et al., 2007), pero también puede generarse en compartimentos intracelulares como el retículo endoplásmico (Skovronsky et al., 1998). Siendo un péptido soluble de 4 kDa, el β A amiloidogénico puede unirse a varias biomoléculas como lípidos, proteínas y proteoglicanos intracelulares (LaFerla et al., 2007). Cuando el β A es liberado al espacio extracelular, comienza a interactuar con otras moléculas de β A y a acumularse, formando una amplia gama de oligómeros y agregados solubles (monómeros y oligómeros diméricos, triméricos y tetraméricos) de manera progresiva. Gradualmente, el β A puede aglomerarse en forma de proto-fibrillas y fibrillas insolubles con alto peso molecular (Crouch et al., 2008). Estas fibrillas dan lugar a depósitos de β A y a las placas seniles, unas lesiones multicelulares constituidas del β A organizado en láminas β plegadas (D. J. Selkoe, 2001a; Walsh y Selkoe, 2007) (Figura 1.4). Las placas seniles son caracterizadas por la acumulación del β A en su núcleo y por presentar en su periferia neuritas distróficas que contienen mitocondrias, lisosomas y microtúbulos anormales (Braak y Braak, 1995).

Proteína Tau

La proteína tau participa en la modulación de la formación y estabilización de los microtúbulos neuronales, los que son parte del sistema de transporte axonal. En la EA, ocurre una alteración que induce la hiperfosforilación y disociación de la proteína tau de los microtúbulos, en este estado denotada como fosfo-tau o p-tau. Esto resulta en la formación de marañas neurofibrilares constituidas de agregados intracelulares de

filamentos helicoidales pareados (PHFs) que producen disfunción neuronal (Maccioni y Cambiazo, 1995). Esta disfunción yace en la perturbación de las funciones estructurales y regulatorias del citoesqueleto celular. Como consecuencia, las neuronas sufren de problemas en su morfología, transporte axonal, función sináptica y neurodegeneración (Roy et al., 2005) (Figura 1.4). De acuerdo a estudios histopatológicos, la acumulación de los PHFs inicia en regiones relevantes para la memoria, que son el lóbulo temporal, el giro cingulado y la corteza frontal. Posteriormente esta se extiende durante el transcurso de la EA y tiene una progresión sistemática (Braak y Braak, 1991) que estaría contribuyendo a la disfunción cognitiva y neurodegeneración.

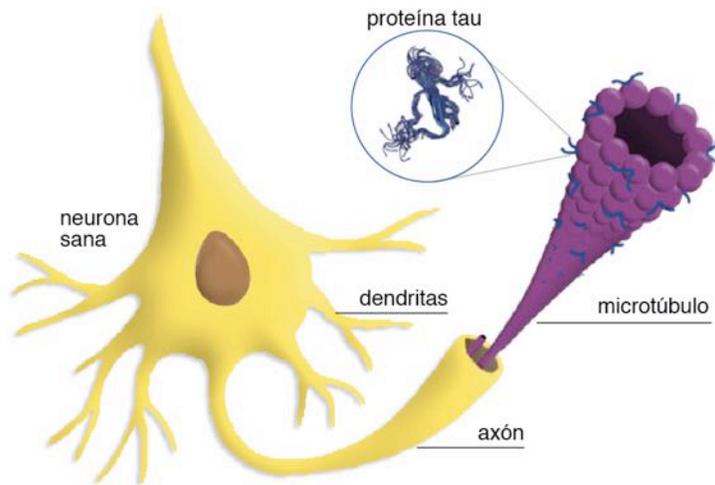


Figura 1.3 Representación de una neurona sana.

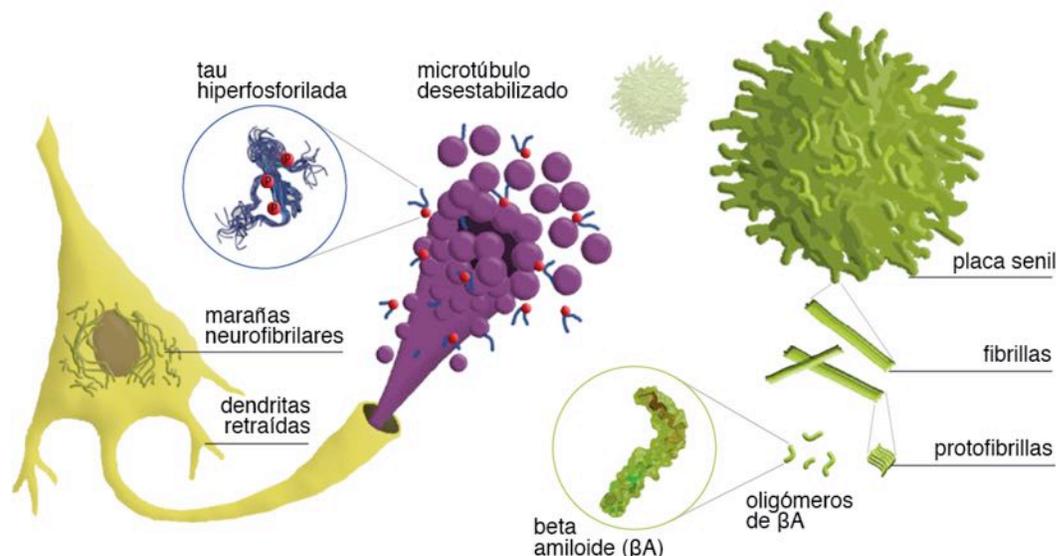


Figura 1.4 Representación de una neurona en la EA. La proteína tau se hiperfosforila, causando la desestabilización de los microtúbulos y formación de marañas neurofibrilares. A diferencia de la neurona sana, el péptido βA incrementa su presencia en el tejido cerebral, primero en forma de oligómeros que se pueden acumular gradualmente en forma de protofibrillas para formar fibrillas y placas seniles.

Hipótesis de la cascada del amiloide

El conocimiento sobre la fisiopatología y etiología de la enfermedad aún es fragmentado, pero se han propuesto algunas hipótesis. En la *hipótesis de la cascada del amiloide*, se propone que el βA es el origen de la enfermedad y el primer evento patológico. Esta describe que la acumulación del βA desencadena la agregación de marañas neurofibrilares (PHFs), las que inducirán mecanismos de muerte neuronal y producirán la manifestación de la demencia (Hardy y Higgins, 1992) (Figura 1.5).

Actualmente, es la hipótesis más aceptada sobre la etiología de la EA. La evidencia que la apoya es: *a)* la presencia comprobada de los marcadores neuropatológicos en la EA; *b)* el descubrimiento de la genética del tipo familiar de la EA, de lo que se hablará más adelante; *c)* la neurotoxicidad demostrada del βA en tejido, y *d)* los efectos observados del βA sobre modelos experimentales de la EA (A. Armstrong, 2014). Los puntos que esta hipótesis tiene en contra sobre el origen de la enfermedad son que *a)* en etapas tempranas de la enfermedad las placas seniles no coinciden espacialmente con las marañas neurofibrilares y la neurodegeneración, y que *b)* la cantidad del βA no tiene una relación directa con el déficit cognitivo (Drachman, 2014). Lo que es esencial destacar de esta hipótesis es que la progresión de la EA es resultado de un incremento del βA en las regiones del cerebro afectadas, y tanto la acumulación total del βA como su estado de agregación influyen en el desarrollo de este padecimiento (Crouch et al., 2008).



Figura 1.5 La hipótesis de la cascada del amiloide como fue propuesta por Hardy y Higgins

En adición a lo propuesto en la hipótesis de cascada amiloide y sin considerar los factores bioquímicos o genéticos que determinan la acumulación u oligomerización del β A, se reconoce que el β A contribuye de forma directa al declive cognitivo y a la neurodegeneración característica de la EA (Crouch et al., 2008). Estos oligómeros se encuentran en grandes cantidades en pacientes con la EA, hasta 70 veces más que en pacientes control (Gong et al., 2003). Los oligómeros solubles del β A son pequeños y suficientemente solubles para difundirse a través del tejido cerebral y afectar la función neuronal hasta comprometer la supervivencia de la célula. Esto ya fue demostrado al encontrar que el β A resulta ser neurotóxico en cultivos celulares (Lambert et al., 1998). Las formas más tóxicas de este péptido son β A40 y β A42, denominadas de esta forma por el número de residuos que poseen. Adicionalmente, existe evidencia de que el β A produce disfunción en la mitocondria (Crouch et al., 2008), induce estrés oxidativo (Siegel et al., 2007), interfiere en la estabilidad de la membrana celular (Crouch et al., 2008), altera el transporte o tráfico axonal (Götz et al., 2004), y promueve disfunción de la sinapsis (D. Selkoe, 2002). Lo último en particular es digno de resaltar, ya que las alteraciones en la función sináptica y en los mecanismos de plasticidad tienen un efecto directo en el declive cognitivo observado en la EA.

Aunque se ha demostrado la toxicidad de los péptidos del β A y los PHFs, aún no se sabe con certeza si son la causa o consecuencia de la EA y cuál es su papel definitivo en la enfermedad. La discusión y la investigación continúan en la búsqueda de entender la EA a mayor profundidad.

Bases genéticas del Alzheimer

La causa de la EA es aún incierta. No obstante, en la actualidad se ha aceptado que son numerosos los factores que influyen en la predisposición y progresión del padecimiento. El reconocimiento de un origen genético de la enfermedad de Alzheimer se dio a través de estudios de ligamiento genético que resultaron en el descubrimiento de mutaciones particulares. A partir de ellos es que se han descrito dos manifestaciones de la enfermedad,

a grandes rasgos identificadas como la EA de tipo familiar y la EA tipo esporádica (D. J. Selkoe, 2001a).

La EA familiar, de la cual el 60% de los casos se clasifica como Enfermedad de Alzheimer de inicio temprano (EOAD por sus siglas en inglés), se transmite de forma autosómica dominante y se presenta antes de los 65 años de edad. Las formas de la EA familiar son evidencia de una relación entre el desarrollo de la enfermedad y la producción anormal del β A (Crouch et al., 2008), ya que son consecuencia de mutaciones de alta penetrancia en al menos tres genes (*APP*, *PSEN1*, y *PSEN2*) implicados en el procesamiento de la APP. Es importante señalar que la EA familiar no representa más del 5% de los casos diagnosticados (D. J. Selkoe, 2001a).

La EA esporádica, la cual representa la gran mayoría de los casos diagnosticados, también se encuentra influenciada por factores genéticos, sin embargo, se ha encontrado que podrían estar implicados numerosos genes de riesgo que tienen patrones de interacción complejos e intrincados entre sí, así como una influencia de factores no genéticos. El tipo esporádico generalmente se asocia con un desarrollo tardío de la enfermedad.

Además de mutaciones, se han encontrado variaciones de genes, llamados polimorfismos, generalmente asociados al desarrollo tardío de la EA. Dos polimorfismos comunes son los haplotipos APOE ϵ 4 y APOE ϵ 2. Estos son polimorfismos de la ApoE, una apolipoproteína transportadora de colesterol, y existe evidencia que la ApoE está involucrada en la acumulación del β A, probablemente en relación a la limpieza del β A (Kim et al., 2014). La secuenciación del genoma humano y el desarrollo de Estudios de Asociación de Genoma Completo (GWAS por sus siglas en inglés) han descubierto polimorfismos adicionales en los últimos 5 años (Bennett et al., 2015).

La EA es un padecimiento de etiología multifactorial y heterogénea. Aunque exista evidencia que apoye un rol causal para el β A en la patogénesis de la EA, se han considerado muchos otros factores, entre los cuales podemos mencionar a la α -sinucleína, alteraciones vasculares, respuestas gliales, inflamación, estrés oxidativo, determinantes epigenéticas y factores ambientales, los cuales podrían tener un papel patogénico importante, especialmente en las formas más comunes de la EA esporádica (Palop y Mucke, 2010).

1.2 Tratamientos para la Enfermedad de Alzheimer

A falta de un tratamiento o cura efectiva, gran parte de la investigación sobre la EA se ha dedicado al desarrollo de fármacos y terapias que puedan aminorar los síntomas de la

enfermedad y disminuir su progreso. A grandes rasgos, los tratamientos se pueden clasificar en sintomáticos y de progresión.

Tratamientos sintomáticos

Los tratamientos sintomáticos más utilizados para el tratamiento de la EA derivaron a partir de estudios *post mortem*, en los cuales se encontró degeneración y pérdida de neurotransmisión de neuronas colinérgicas de los núcleos basales de Meynert que proyectan hacia la corteza cerebral. De este descubrimiento surgió la *hipótesis colinérgica de la EA*, la cual postula que el déficit cognitivo observado en pacientes se debe a una disfunción colinérgica (Bartus et al., 1982). Al poco tiempo se desarrollaron fármacos para compensar este déficit, entre los cuales destacan los inhibidores de la enzima acetilcolinesterasa. Fármacos como donepezil, galantamina y rivastigimina inhiben la actividad de esta enzima, incrementando la actividad colinérgica y aminorando síntomas cognitivos (Schneider, 2013).

La memantina es otro fármaco de tratamiento sintomático que al bloquear parcialmente la actividad del receptor N-metil-D-aspartato (NMDA), protege de neurotoxicidad mediada por calcio y glutamato, la cual deriva de la estimulación excesiva del sistema glutamatérgico (Raina et al., 2008; Schneider, 2013).

Los tratamientos mencionados ayudan a disminuir los síntomas cognitivos que se presentan en la EA. Sin embargo, la progresión de la enfermedad no se detiene con su uso y eventualmente pierden su efecto terapéutico.

Tratamientos de progresión

La acumulación del β A y los PHFs como marcadores histopatológicos principales de la EA, ha conducido a la búsqueda de tratamientos que incidan en disminuir su agregación o interferir en su procesamiento.

Los enfoques experimentales que se han utilizado para tratamientos anti- β A son la utilización de inhibidores y moduladores de la γ -secretasa, como semagacestat y avagacestat, e inhibidores de la β -secretasa (Schneider, 2013). Se han realizado pruebas clínicas de anticuerpos monoclonales y también se han buscado métodos para incrementar la función de la APOE ϵ 4 para aumentar la limpieza del β A (Schneider, 2013). A pesar que en varias pruebas clínicas se ha logrado disminuir la acumulación del β A en cerebro, no hay una relación clara con una mejora clínica en los pacientes.

Algunas estrategias terapéuticas anti-tau incluyen el desarrollo de inhibidores de cinasas de tau y el incremento de actividad de fosfatasa para mejorar la estabilidad de microtúbulos

(Schneider, 2013). También se ha buscado el bloquear o inhibir la hiperfosforilación de tau, sus agregados y formación de filamentos con fármacos y anticuerpos. Pocas de estas estrategias han pasado a pruebas clínicas fase 2 (Boutajangout et al., 2011; Fuentes y Catalan, 2011).

Otros tratamientos se han dirigido a la activación e inhibición de receptores neuroquímicos que tendrían efecto en la generación de β A o en modular la actividad de las secretasas en algunos modelos preclínicos (Schneider, 2013). El reto a la efectividad de estos fármacos yace en un mayor entendimiento del proceso patológico de la enfermedad, ya que se han obtenido resultados mixtos de éstos.

Aunque varios fármacos y estrategias terapéuticas parecen prometedores, aún hay preguntas por resolver respecto a los mecanismos de la enfermedad que son clave para el desarrollo de tratamientos más completos y efectivos.

1.3 Modelos animales para la Enfermedad de Alzheimer

El desarrollo de modelos animales ha sido importante en la investigación en la EA para reproducir las características patológicas y conductuales que se han observado en humanos. Gracias a ellos, han sido posibles grandes avances en el conocimiento sobre este padecimiento. Principalmente se han empleado dos métodos para el desarrollo de modelos animales. El primero implica el desarrollo de modelos transgénicos y el segundo la administración de agentes neurotóxicos que generan lesiones similares a las que se observan en la EA.

Modelos transgénicos

Unos de los modelos más utilizados para el estudio de la enfermedad son los ratones transgénicos, porque desarrollan una patología similar en cerebro a la observada en humanos. Ya que la etiología de la EA aún se desconoce, estos modelos se han desarrollado con la base genética de la EA familiar, lo que ha sido invaluable para entender la enfermedad a un nivel fisiopatológico y para probar nuevos fármacos con potencial terapéutico. Actualmente hay una considerable variedad de modelos murinos, aunque es importante mencionar que cada uno presenta ventajas y desventajas, además que no existe uno que presente todas las características de la EA dada su complejidad.

Entre algunos modelos a mencionar son los ratones transgénicos con mutantes de la APP humana (hAPP). Éstos acumulan el β A en forma de placas y también presentan déficit cognitivo, aunque no exhiben pérdida neuronal significativa. También se han diseñado ratones con mutaciones en la presenilina (*PSEN1*), los cuales presentan un incremento en

los niveles de β A42 pero no desarrollan la patología de EA y problemas cognitivos (LaFerla y Green, 2012). Existen modelos como el ratón 5XFAD y el 2xKI, que combinan mutaciones de *APP* y *PSEN1* para producir una patología amiloide más completa (Hall & Roberson, 2012).

El estudio de la patología de las marañas neurofibrilares en ratones transgénicos no se ha quedado atrás. Se han desarrollado modelos con la mutación P301L¹ del gen de la proteína tau humana (*MAPT*), causante de demencia frontotemporal en humanos. Esta mutación favorece la acumulación de los PHFs, y en conjunción con mutantes de patología amiloide, han resultado modelos como TAPP, JNPL3 y 3xTgAD (Hall & Roberson, 2012).

Modelo triple-transgénico 3xTg-AD

Un modelo animal destacado es el modelo de ratón triple transgénico de la EA (3xTg-AD) (Oddo et al., 2003). Este modelo tiene la característica de acumular β A de manera intraneuronal y extracelular, así como la acumulación de la proteína p-tau. Este ratón tiene tres mutaciones: la mutación P301L, la mutación APP_{swe} ² (sueca) y la mutación M146V³ del gen *PSEN1*. Estos genes producen la acumulación progresiva del β A y marañas de proteína tau en regiones análogas (homólogas) al cerebro humano. A los 6 meses, estos animales comienzan a mostrar deficiencia en el aprendizaje y alteraciones en la plasticidad sináptica, los cuales se asocian a la acumulación del β A (Oddo et al., 2003). Conforme el ratón envejece y la neuropatología progresa, se producen cambios estructurales en las neuronas que incrementan los déficits de memoria y de aprendizaje. Este modelo es útil para estudiar el impacto del β A y p-tau en procesos de memoria y plasticidad sináptica, así como en la evaluación de eficacia de terapias anti-EA.

¹ La mutación P301L del gen *MAPT* produce una sobre expresión de la proteína tau humana con la isoforma 4R/2N que resulta en un incremento de tau hiperfosforilada y formación de PHFs.

² APP_{swe} (KM670/671NL) es una doble mutación de sustitución de lisina y metionina por asparagina y leucina, produciendo un incremento en los niveles de β A, específicamente β A40 y β A42.

³ Esta mutación altera el funcionamiento de una proteína que forma parte del complejo de la enzima γ -secretasa, fomentando la amiloidogénesis.

2 Antecedentes

2.1 Alteraciones sinápticas y neuroquímicas en la EA

La importancia del déficit en el aprendizaje y la memoria como síntoma de la EA, ha conducido a la realización de numerosos trabajos que han intentado entender la relación que existe entre los procesos fisiológicos que permiten la formación y mantenimiento de la memoria, con los procesos patológicos observados en la EA.

La corteza entorrinal, en la cual se encuentran regiones relevantes para procesos de aprendizaje y memoria, es la primera en mostrar alteraciones en pacientes con EA, particularmente el hipocampo (Braak & Braak, 1995). Estas alteraciones se han atribuido a la acumulación de PHFs, fenómeno asociado a la presencia excesiva de β A. Cabe destacar que es cuantiosa la evidencia que demuestra que el β A, particularmente en sus formas oligoméricas, juega un papel importante en los déficits sinápticos en la EA (Mucke et al., 2000). Se ha observado que ratones transgénicos de la APP muestran una disminución en los niveles de sinaptofisina, así como pérdida de espinas dendríticas (Hsia et al., 1999; Spires, 2005). El reporte del equipo de Klein (2007) describe que en un modelo murino transgénico, los oligómeros de β A se unen a las sinapsis y a las espinas dendríticas, produciendo una morfología de espina anómala y pérdida de receptores NMDA. Similarmente, el β A se une a los receptores nicotínicos α -7 de ratas con gran afinidad y contribuye a la profunda pérdida de transmisión colinérgica observada en la EA (Wang et al., 2000). En otros trabajos, los niveles altos del β A también resultan en una alteración en la transmisión glutamatérgica (Kamenetz et al., 2003; O'Shea et al., 2008). El β A no solamente puede causar anomalías en la neurotransmisión, sino que también puede intervenir en vías de señalización de LTP e inducir la endocitosis de receptores sinápticos AMPA⁴ y NMDA⁵ (Hsieh et al., 2006; Wisniewski et al., 2011), y su administración *in vivo* e *in vitro* ha mostrado afectar la transmisión sináptica y la inducción de LTP en ratas (Cleary et al., 2005; Cullen et al., 1997; Walsh et al., 2002), interfiriendo con la formación de trazos de memoria e inhibiendo la plasticidad sináptica.

⁴ Los receptores ionotrópicos para glutamato AMPA (receptor del ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico) se encuentran en las sinapsis excitatorias y median la transmisión basal sináptica

⁵ Los receptores NMDA (N-metil-D-aspartato) son receptores ionotrópicos glutamatérgicos. Cuando los receptores AMPA tienen una alta actividad sináptica por periodos breves, se activan los receptores NMDA, los cuales inducen el incremento de número de receptores AMPA, el crecimiento de espinas dendríticas, y la potenciación a largo plazo (LTP) de la transmisión sináptica (Bliss & Lomo, 1973).

Siendo la disfunción sináptica el factor más importante que influye en la pérdida de memoria en pacientes con la EA en etapas tempranas (Sze et al., 1997) y el β A un agente causal y contribuyente, resulta relevante recuperar el funcionamiento adecuado de los sistemas de neurotransmisión y disminuir el impacto del β A sobre éstos. El uso de fármacos con efectos en receptores específicos, así como inmunoterapias anti- β A (Klyubin et al., 2005), han sido frecuentemente utilizados para estos fines. El incremento de transmisión serotoninérgica a través de inhibidores de recaptura, ha sido efectivo en reducir los niveles del β A y placas seniles tanto en pacientes como en un modelo murino transgénico de APP (Cirrito et al., 2011). La memantina se ha utilizado como antagonista de NMDA para regular la transmisión glutamatérgica (Klein et al., 2007), además de inducir la recuperación de la inervación de fibras colinérgicas, mejorar la memoria en ratas (Nyakas et al., 2011) y disminuir niveles del β A en tratamientos crónicos (Martinez-Coria et al., 2010).

Si bien algunos tratamientos que buscan restaurar la transmisión glutamatérgica y colinérgica han mostrado un grado de efectividad, los procesos cognitivos son complejos e implican la interacción de circuitos neuronales y distintos sistemas de neurotransmisión (Kandel y Schwartz, 2013; Vianna et al., 2000). Resulta necesario estudiar otros circuitos y regiones involucradas en procesos de aprendizaje y memoria que también estarían siendo afectados por la progresiva acumulación de la neuropatología y las consecuentes alteraciones que desencadena. El sistema dopaminérgico es uno de los sistemas cuya relevancia en la EA no ha sido estudiada con la misma profundidad.

2.2 La enfermedad de Alzheimer y el sistema dopaminérgico

La dopamina es una molécula simple que deriva del aminoácido tirosina (Tyr) y pertenece a la familia de las catecolaminas, neurotransmisores caracterizados por presentar un grupo catecol. A su vez, las catecolaminas pertenecen al grupo de las monoaminas. Además de ser esencial en el control motor, la dopamina también participa en dominios conductuales como la atención, el deseo, y el sistema de motivación y recompensa.

La función dopaminérgica se encuentra alterada en la EA

Se ha demostrado que la función dopaminérgica comienza a alterarse con el envejecimiento. Las neuronas y transportadores de dopamina disminuyen en hipocampo y en la corteza frontal, incrementando la probabilidad del desarrollo de problemas motores y demencia (Bäckman et al., 2010; Volkow et al., 1994). En la EA, este sistema se encuentra aún más afectado. En humanos, estudios *post mortem* en cerebros de pacientes con la EA han demostrado disminución significativa de dopamina en regiones como hipocampo, giro cingulado, amígdala, estriado, núcleos *raphe*, caudado y *locus coeruleus* (Martorana y

Koch, 2014; Nazarali y Reynolds, 1992; Storga et al., 1996; Wenk, 2003), así como una disminución de levodopa⁶ y su metabolito DOPAC (Ácido 3,4-dihidroxifenilacético) respecto a controles (Storga et al., 1996). También se ha encontrado una marcada pérdida de receptores dopaminérgicos D₁ y D₂ en los lóbulos temporales y frontales, siendo éstas regiones asociadas a funciones cognitivas (Kemppainen et al., 2003; Kumar y Patel, 2007; Martorana et al., 2010). No solamente se ha reportado una disminución de la concentración del neurotransmisor y sus receptores, sino también pérdida de fibras catecolaminérgicas (Kalaria y Andorn, 1991). Esto tendrá un efecto directo en el desarrollo de la demencia y el declive cognitivo en los pacientes si los niveles de dopamina se encuentran alterados (Martorana & Koch, 2014).

El sistema dopaminérgico tiene relevancia en procesos cognitivos

La deficiencia de transmisión dopaminérgica tiene implicaciones considerables sobre los procesos de aprendizaje y memoria. Los receptores dopaminérgicos D₁/D₅ juegan un papel importante en la cognición, mediando fenómenos de plasticidad y aspectos específicos de la función cognitiva, incluyendo procesos de memoria (Dalley et al., 2009). La dopamina es un modulador clave en la plasticidad sináptica (Lisman et al., 2011; Pignatelli et al., 2015), y la administración de fármacos que estimulan la actividad dopaminérgica mejoran el aprendizaje en humanos (Nitsche et al., 2009; Shearman et al., 2006). Hasta ahora, la relación entre dopamina y la EA se ha limitado a evidencia indirecta, donde los pacientes con la EA tienen un mejor desempeño cognitivo al tener una mayor síntesis de dopamina estriatal (Kemppainen et al., 2003; Tanaka et al., 2003). Pinessi y colaboradores (1987), encontraron que la severidad de la pérdida de inervación monoaminérgica, que incluye a la dopaminérgica, tiene una correlación con la duración de la enfermedad en EA.

La neuropatología en modelos animales altera la actividad dopaminérgica

En modelos animales para la EA, existe evidencia que muestra un efecto de la neuropatología sobre el sistema dopaminérgico. En el modelo murino de la EA APP_{swe}/PS1ΔE9, se ha asociado a la patología amiloide con déficits cognitivos (Savonenko et al., 2005) y una degeneración progresiva de neuronas dopaminérgicas (Liu et al., 2008; Trillo et al., 2013). Se ha sugerido que los depósitos del βA insoluble no son los agentes tóxicos, sino las formas oligoméricas más pequeñas del βA (Liu et al., 2008). Los ratones APP23 que sobre-expresan la mutación sueca (K670M/N671L) muestran una disminución significativa en la densidad de fibras positivas a TH (tirosina hidroxilasa⁷) en la formación hipocampal así como en el neocórtex dorsolateral. Además, el daño significativo y pérdida

⁶ La levodopa (L-DOPA; L-3,4-dihidroxifenilalanina), es el precursor metabólico de las catecolaminas, siendo éstas la DA, la noradrenalina (NE) y adrenalina.

⁷ La tirosina hidroxilasa (TH) es la enzima que cataliza la conversión del aminoácido L-tirosina a levodopa (LD). La TH es la enzima limitante en la biosíntesis de catecolaminas, y su expresión en neuronas es indicativo de actividad catecolaminérgica (Cartier et al., 2010).

de fibras positivas a TH se ha detectado en la cercanía de depósitos del β A en estos ratones (Diez et al., 2003). Los ratones 5xFAD también muestran una disminución en la expresión de TH en núcleos catecolaminérgicos (Kalinin et al., 2012). En ratas, se ha descrito que la infusión del β A40 en el *núcleo accumbens* inhibe la liberación de dopamina que se produce con agonistas colinérgicos en esta región (Preda et al., 2008), y la administración del β A42 también disminuye los niveles corticales de dopamina (Trabace et al., 2007). Por ende, la deficiencia dopaminérgica es un fenómeno común en modelos transgénicos para la EA y el β A es tóxico hacia neuronas catecolaminérgicas.

Jürguensen y colaboradores (2011) reportaron que la administración del agonista dopaminérgico SKF81297 previene la inhibición de la LTP inducida por el β A soluble en rebanadas de hipocampo de rata. La activación de receptores D_1/D_5 por medio de SKF81297, incrementó la inserción sináptica de receptores NMDA y AMPA. Como resultado, hay un incremento de actividad del receptor NMDA y de la potenciación sináptica (LTP). Estos resultados implican que la actividad dopaminérgica puede compensar la disfunción de mecanismos de plasticidad sináptica inducidos por la presencia de oligómeros de β A.

El ratón 3xTg-AD muestra deficiencia en el aprendizaje a los 6 meses y presenta alteraciones en la plasticidad sináptica, fenómenos que se han asociado a la acumulación del β A (Oddo et al., 2003). Un estudio realizado en nuestro laboratorio evaluó si los ratones 3xTg-AD presentaban disfunción dopaminérgica. Se sabe que la dopamina tiene un papel importante en la memoria de reconocimiento, en la que la actividad de los receptores D_1 es necesaria para la formación de esta memoria a largo plazo en roedores (Balderas, Moreno-Castilla, y Bermudez-Rattoni, 2013; de Lima et al., 2011; Nagai et al., 2007). Al realizarles una prueba de memoria de reconocimiento de objetos (ORM) (véase pág.31), encontraron que a diferencia del ratón silvestre viejo, los ratones transgénicos viejos no distinguieron un objeto previamente presentado respecto a un objeto novedoso. Durante la adquisición de la tarea, se midieron los niveles de neurotransmisores en la corteza insular (CI) e hipocampo, regiones relevantes para el desempeño de esta memoria, y se observó que los animales transgénicos tenían un déficit en la liberación de dopamina cuando estaban adquiriendo la información sobre los objetos. Para saber si este déficit era lo que impedía que los ratones aprendieran la tarea, se les administró nomifensina, un inhibidor de la recaptura de DA, el cual incrementó los niveles de dopamina en la CI. Como resultado, los animales que antes presentaban deficiencia en el desempeño de la tarea, recuperaron la capacidad de distinguir los objetos novedosos de los previamente conocidos. Estas observaciones demuestran que en el ratón transgénico viejo hay un déficit en la neurotransmisión dopaminérgica asociada a la patología de la EA que afecta la formación de la memoria de reconocimiento, la cual que puede ser restaurada con el incremento de niveles de dopamina (Guzmán-Ramos et al., 2012).

De acuerdo con el estudio anterior, en un trabajo de nuestro laboratorio se demostró que el β A disminuye los niveles corticales de dopamina y altera la formación de memoria de reconocimiento gustativo al inhibir la facilitación sináptica (LTP) en ratones transgénicos 3xTg-AD. El condicionamiento de aversión al sabor (CAS⁸) es un paradigma de aprendizaje gustativo que requiere la liberación de dopamina en la CI para la formación de la memoria (Bermúdez-Rattoni et al., 2004; Guzmán-Ramos, et al., 2010). Se encontró que los ratones 3xTg-AD envejecidos no mostraron liberación de dopamina durante el aprendizaje de la tarea, lo que coincide con una pérdida de TH y de aferencias del VTA⁹ (área ventral tegmental) hacia la CI. Al administrar nomifensina a los transgénicos viejos, se incrementó la concentración de dopamina en la CI y se recuperó la formación de memoria gustativa y la expresión de LTP. En ratones silvestres, la administración de oligómeros de β A en la CI alteró el CAS, disminuyó los niveles de dopamina y TH e indujo la expresión de LTD en lugar de LTP (Moreno-Castilla et al., 2016). Estos resultados indican que la transmisión y neuromodulación dopaminérgica es necesaria para la formación de la memoria gustativa y para la expresión de LTP en la CI, la cual se encuentra alterada en el ratón 3xTg-AD viejo por la acumulación extensa y progresiva del β A intracelular.

Los trabajos anteriores apoyan la noción que la transmisión dopaminérgica ayuda a mitigar los efectos tóxicos del β A que producen disfunción cognitiva. Varios fármacos asociados a la dopamina y su actividad ya han sido probados en el pasado con diferentes resultados y distintas suposiciones respecto a los mecanismos de acción. Algunos inhibidores de la enzima degradadora de catecolaminas COMT (Catecol-O-metiltransferasa), como tolcapone y entacapone, pueden reducir la oligomerización del β A (Di Giovanni et al., 2010). Por el contrario, el pramipexol, un agonista dopaminérgico, no pareció tener un efecto (Trillo et al., 2013). La selegilina, un inhibidor de la enzima degradadora de monoaminas MAO-B (monoamino-oxidasa B), se ha utilizado para incrementar la concentración de dopamina y tuvo éxito en una prueba clínica (Filip & Kolibás, 1999), sin embargo, otro estudio con la misma no mostró mejoras cognitivas en pacientes con la EA (Freedman et al., 1998). La inconsistencia en estos trabajos estaría indicando que es necesario estudiar los mecanismos terapéuticos con mayor detenimiento para hallar el tratamiento más adecuado.

Un reporte interesante (Ono et al., 2013) muestra los efectos de agentes anti-Parkinsonianos sobre la formación de oligómeros de β A. Por medio de técnicas que

⁸ El condicionamiento de aversión al sabor (CAS; Conditioned Taste Aversion) funge como un mecanismo de defensa que protege animales contra el consumo repetido de alimentos tóxicos. La adquisición de la aversión al sabor sigue las reglas del condicionamiento clásico, donde se condiciona el sabor de una sustancia novedosa a un malestar posterior a su consumo. Como consecuencia, el animal aprende a rechazar el sabor en el futuro y se establece una asociación de estímulo-respuesta, al haber una reacción condicionada (Bures et al., 1998; Welzl, et al., 2001).

⁹ El VTA o área ventral tegmental es un núcleo de neuronas dopaminérgicas localizado en la parte media inferior del mesencéfalo que proyecta axones dopaminérgicos hacia regiones corticales, incluyendo el sistema mesocorticolímbico (Fuxe et al., 2010).

permiten la formación y agregación artificial de oligómeros proteicos, estimaron la cantidad, tamaño y distribución de oligómeros de β A y su interacción con otras moléculas de manera similar a un estado *in vivo*. En sus resultados reportaron que tanto la levodopa como la dopamina exhiben potentes efectos anti-oligoméricos cuando se incuban *in vitro* con β A40 y β A42, impidiendo que estos péptidos se agreguen y formen oligómeros tóxicos. Los autores sugieren que estos efectos son resultado de una interacción molecular directa, donde compuestos con grupo catecol son buenos antioxidantes y se podrían unir de forma covalente y específica a β A libre, impidiendo su agregación. Por consiguiente, la dopamina y la levodopa no solamente tendrían efecto por inducir transmisión dopaminérgica, sino también por su naturaleza anti-oligomérica hacia el β A.

El grupo de Himeno (2011) probó que un agonista dopaminérgico no específico, llamado apomorfina, tiene efectos positivos en un modelo animal para la EA. A ratones 3xTg-AD de 6 meses, se les administró apomorfina vía subcutánea una vez a la semana durante 1 mes. Para evaluar su desempeño en la memoria espacial, realizaron la prueba del laberinto acuático de Morris (MWM) antes y después del tratamiento con apomorfina. Lo que encontraron fue que el fármaco mejora el aprendizaje y ejecución en la memoria espacial y también disminuye el β A y los PHFs acumulados en el hipocampo. En este estudio atribuyen el efecto de la apomorfina a sus propiedades como antioxidante y el incremento que produce sobre la actividad del proteosoma, el cual estaría limpiando el β A dentro de la célula. También se menciona que la estimulación de receptores dopaminérgicos podría tener un efecto protector, pero cuestionan el papel de la estimulación de receptores dopaminérgicos como el mecanismo terapéutico principal. La relevancia de este trabajo yace en que el tratamiento con un agonista dopaminérgico puede disminuir la acumulación de la neuropatología y produce una mejora en el desempeño de una tarea de memoria espacial en el ratón 3xTg-AD.

Ambrée y colaboradores (2009) encontraron que el incremento de los niveles de dopamina produce mejoras cognitivas por medio del tratamiento con levodopa, que ha sido utilizada previamente para tratar la enfermedad de Parkinson. La levodopa fue administrada a una dosis de 50 mg/kg durante 11 días a ratones transgénicos TgCRND8, un modelo que acumula el β A rápidamente al tener dos mutaciones de *APP* y presenta déficits cognitivos desde los 3 meses de edad. Una hora después de la administración de levodopa, les realizaron pruebas de memoria de reconocimiento (ORM) y memoria espacial. Descubrieron que los animales con tratamiento de levodopa mejoran la ejecución de ambas tareas, igualando el desempeño del grupo control. Al realizar un conteo de número de placas del β A en tejido, no encontraron que el tratamiento con levodopa tuviera algún efecto en la disminución de éstas, lo que los autores atribuyen a la brevedad del tratamiento. Adicionalmente hicieron un análisis neuroquímico de los niveles de dopamina y sus metabolitos a ratones TgCRND8 de 3 meses de edad por medio de HPCE

(electroforesis capilar de alto desempeño), y se encontró un incremento de dopamina en la corteza frontal y una disminución de sus niveles en el hipocampo en los ratones transgénicos en comparación a los ratones control. Se menciona que la neuropatología podría estar provocando una desregulación dopaminérgica que repercute en los circuitos involucrados en el aprendizaje y la memoria. En este trabajo concluyeron que el ratón TgCRND8 presenta déficits de aprendizaje que pueden ser disminuidos con un tratamiento de levodopa, el cual compensa la desregulación dopaminérgica causada por la neuropatología tipo EA.

El objetivo de los trabajos mencionados previamente fue el esclarecer los efectos que tiene la EA sobre el sistema dopaminérgico. El detrimento de este sistema de neurotransmisión es claro en pacientes y en modelos animales, los últimos siendo de gran utilidad para entender los procesos patológicos que conducen a la disfunción cognitiva relacionada a la transmisión dopaminérgica, además que han permitido el desarrollo de terapias que contrarresten los síntomas de la EA. Aún hay preguntas por responder respecto a cuál de los mecanismos terapéuticos sobre la actividad dopaminérgica resulta ser el más relevante, y que tipo de fármacos podrían utilizarse para lograr la mayor efectividad terapéutica.

3 Planteamiento del Problema

Gran parte de los estudios que describen las deficiencias cognitivas y los mecanismos de la neurodegeneración en pacientes con la EA y en modelos experimentales, se han enfocado a los sistemas de neurotransmisión colinérgico y glutamatérgico. Sin embargo, el sistema dopaminérgico ha adquirido cada vez mayor relevancia por el papel que desempeña en la modulación de la plasticidad sináptica y su participación en procesos cognitivos. La evidencia de que el β A, en especial su forma oligomérica, ocasiona un detrimento en la transmisión dopaminérgica y en los niveles de dopamina es contundente, tanto en pacientes como en modelos animales. Esta deficiencia dopaminérgica produce una alteración en los mecanismos fisiológicos que subyacen el funcionamiento de los circuitos involucrados en la formación de memorias y en el aprendizaje. Esta información abre la posibilidad de desarrollar nuevos tratamientos basados en la estimulación del sistema dopaminérgico, los cuales habrían de producir una mejora cognitiva y disminuir los síntomas asociados a EA.

Con el fin de compensar el déficit de transmisión dopaminérgica, se han realizado experimentos con distintos fármacos que produzcan la activación del sistema dopaminérgico y disminuyan los déficits cognitivos y plásticos observados. Algunos trabajos han realizado administraciones agudas con agonistas dopaminérgicos o inhibidores de recaptura para incrementar la concentración de dopamina y la actividad de este neurotransmisor. De esta manera han obtenido resultados inmediatos de mejora en conductas que evalúan aprendizaje y memoria, así como en procesos de plasticidad sináptica. Otros trabajos han tenido un enfoque de terapia crónica, donde se ha observado que la incubación *in vitro* del β A con agentes anti-Parkinsonianos como la dopamina y la levodopa, altera la agregación y formación de oligómeros de β A.

La levodopa, que se encuentra de forma natural en el cerebro, es también un fármaco clínicamente probado que ha demostrado incrementar los niveles de dopamina y que también ha demostrado disgregar oligómeros de β A *in vitro*. Un tratamiento basado en una administración prolongada de levodopa no sólo podría producir mejoras cognitivas, sino también disminuiría la agregación de las formas tóxicas del β A que contribuyen al desarrollo de la EA.

3.1 Hipótesis

El aumento de los niveles de dopamina mediante la administración de levodopa mejora la función cognitiva y disminuye la acumulación del β A en el modelo murino 3xTg-AD.

3.2 Objetivo general

Describir el efecto del tratamiento con levodopa sobre el desempeño cognitivo y la acumulación del β A en el modelo 3xTg-AD.

3.3 Objetivos particulares

- Evaluar el efecto del tratamiento con levodopa en el ratón 3xTg-AD sobre el desempeño en la memoria de reconocimiento.
- Monitorear la liberación basal y fásica de dopamina en la corteza insular del ratón 3xTg-AD durante la adquisición de la tarea de memoria de reconocimiento de objetos.
- Evaluar el efecto del tratamiento con levodopa en el ratón 3xTg-AD en la ejecución de dos tareas de memoria espacial.
- Determinar el efecto del tratamiento con levodopa sobre la acumulación del β A en el ratón 3xTg-AD.

3.4 Diseño experimental

El diseño experimental consistió en la evaluación de dos tipos de memoria distintos: la memoria de reconocimiento y la memoria espacial, la primera evaluándose a través de la prueba de memoria de reconocimiento de objetos (ORM) y la última evaluándose con dos tareas distintas, la de memoria de ubicación de objetos (OLM) y el laberinto acuático de Morris (MWM). Durante la tarea de memoria de reconocimiento de objetos (ORM), se realizó la técnica de microdiálisis para el análisis de liberación de neurotransmisores. Al finalizar la prueba de MWM, los animales fueron sacrificados para análisis histológicos. Independientemente de la prueba conductual a la que fueron sometidos, todos los animales fueron tratados durante 16 días con levodopa o solución vehículo.

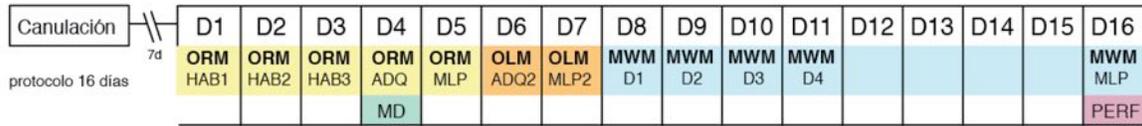


Figura 3.1 Secuencia del protocolo experimental. Los animales que fueron sometidos a cirugía tuvieron un tiempo de recuperación de 7 días antes de iniciar el tratamiento y el protocolo conductual. D1 a D16 representan las dosis administradas cada día durante 16 días. De los días D1 a D5 se realizó el protocolo de ORM, en donde se realizaron las habituaciones (HAB), la adquisición (ADQ) simultánea al protocolo de microdiálisis (MD), y la prueba de memoria de largo plazo (MLP). En los días D6 y D7 se realizó la prueba de OLM, donde se realizaron una adquisición (ADQ2), y memoria de largo plazo (MLP2). En los días D8 a D16 se realizó el protocolo de MWM, donde se muestran los días de entrenamiento (MWM D1-D4) y la prueba de memoria de largo plazo (MWM MLP). Finalizada la prueba, los animales fueron sacrificados (PERF).

4 Metodología experimental

4.1 Sujetos

Se utilizaron ratones macho triple-transgénicos homocigotos¹⁰ de 12 meses (modelo para la EA (3xTg-AD)). Los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-CZOO-199) y con la aprobación del Comité Local de Cuidado Animal (FBR30-14). Cuando no realizaban protocolos conductuales, los ratones eran alojados individualmente en cajas de acrílico a temperatura de entre 22 y 24° C con ciclos controlados de luz/oscuridad de 12/12 h, y con acceso a agua y alimento *ad libitum* dentro del *vivarium* del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

Ratón 3xTg-AD

El modelo de ratón triple transgénico es resultado de la inserción de dos transgenes humanos independientes. El gen *APP* con la mutación sueca (KM670/671NL), y el gen de tau (*MAPT*) con la mutación P301L, fueron co-microinyectados en embriones unicelulares de la cepa de ratón *knock-in* PS1_{M146V} (PS1M146V KI)¹¹. Los transgenes están controlados por el elemento regulatorio *Thy1.2*, el cual permite la expresión de los genes exclusivamente en el sistema nervioso. La progresión de la neuropatología es espacialmente y temporalmente comparable a la observada en humanos, ya que conforme el ratón envejece, la acumulación progresa. La inmunoreactividad al β A intraneuronal se puede detectar en el neocórtex entre los 3 y 4 meses de edad y para los 6 meses en la región de CA1 del hipocampo. A los 12 meses, se pueden observar depósitos extracelulares evidentes en la corteza frontal e hipocampo. También es a esta edad cuando se detecta la inmunoreactividad de patología tau en hipocampo y luego progresa hacia estructuras corticales (Oddo et al., 2003).

¹⁰ Cepa transgénica obtenida de Jackson Laboratory (<http://jaxmice.jax.org/strain/004807.html>).

¹¹ El ratón PS1M146V KI se generó al inducir mutaciones puntuales en el exón 5 del gen *PSEN1* endógeno, cambiando los codones 145 y 146 de isoleucina y metionina por valina y valina, respectivamente. El fondo de los ratones *knock-in* PS1M146V es un híbrido 129/C57BL/6, o B6;129 (Guo et al., 1999).

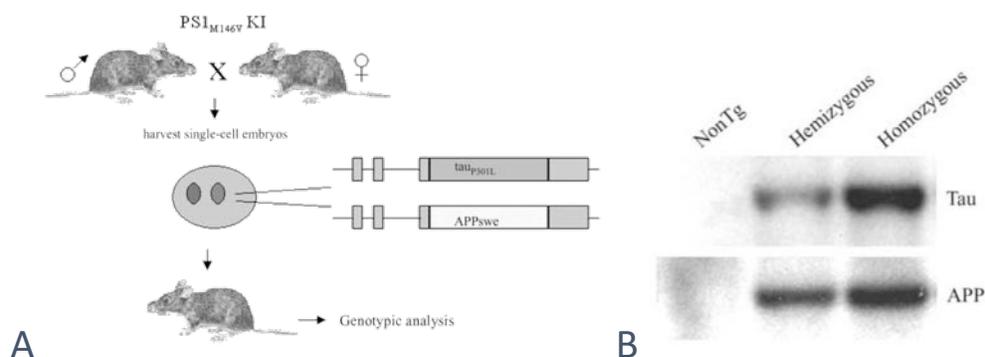


Figura 4.1 Ratón 3xTg-AD. **A:** Estrategia utilizada para desarrollar los ratones. Utilizando la técnica de microinyección pronuclear, se co-inyectaron los dos transgenes independientes al embrión. La secuencia genómica completa de $Thy1.2$ se muestra con sus exones como cajas y las secuencias no codificantes como líneas delgadas. Los embriones inyectados fueron reimplantados en las madres receptoras y la progenie resultante se genotipificó como 3xTg-AD. **B:** Análisis genotípico para la identificación de ratones homocigos. El Southern blot compara la dosis de los transgenes de tau humana y APP del DNA extraído del ratón, demostrando que la transmisión de los transgenes fue exitosa. Modificado de Oddo y cols. (2003).

No se utilizaron hembras en el experimento porque se ha reportado un déficit cognitivo en hembras 3xTg-AD que es más acentuado respecto a los machos y es dependiente de la edad (Clinton et al., 2007; Sterniczuk et al., 2010). Este fenómeno se ha atribuido al efecto regulatorio que tiene el estrógeno y la progesterona en las hembras sobre el desarrollo de la neuropatología (Carroll et al., 2007). Adicionalmente, se ha encontrado que las hembras de ratón común tienen una mayor tolerancia a responder a los efectos de la levodopa que los ratones macho (Tang & Cotzias, 1977).

De los animales empleados ($n=44$), algunos fueron sometidos a cirugía para la implantación de cánulas y el resto no estuvo bajo ningún procedimiento quirúrgico. Todos los sujetos participaron en pruebas conductuales.

4.2 Administración de Levodopa

El fármaco levodopa (3,4-Dihidroxi-L-fenilalanina; Sigma; St. Louis, E.E.UU) se administró a una dosis de 50 mg/kg vía intraperitoneal (i.p.). La solución de administración se preparó de la siguiente manera: por cada 10 mg de levodopa, se añadieron a) 404 μ L de HCl 0.22 M para disolverla; b) 500 μ L de solución amortiguadora de fosfatos (PB) 0.4 M pH 7.45 para adecuar la solución a un pH fisiológico; y c) 96 μ L de agua desionizada para que la solución tuviera una concentración de levodopa de 10 mg/mL. La concentración molar final fue 51 mM de Levodopa, 88 mM de HCl, y 200 mM de PB. La solución vehículo (control) se preparó de la misma manera a excepción que no se añadió el fármaco. La solución se preparaba diario justo antes de administrar a los animales para evitar la degradación del

fármaco. De acuerdo a estudios de farmacocinética, la levodopa cruza la barrera hematoencefálica¹² y alcanza su concentración máxima en plasma de 1 a 3 horas de su administración (Bredberg et al., 1994; Contin y Martinelli, 2010).

De los 44 animales utilizados en el experimento, 24 fueron tratados con levodopa y 20 fueron tratados con solución vehículo. Ambas soluciones se administraron a los respectivos sujetos diariamente a la misma hora en toda la duración del protocolo experimental (16 días). Cuando los animales estaban sujetos a un protocolo conductual, la administración de la dosis correspondiente se realizó una hora antes del comienzo de la prueba conductual. Los días de tratamiento establecidos se basaron en resultados previos del trabajo de Ambrée y colaboradores (2009).

4.3 Análisis de neurotransmisores

La realización del análisis neuroquímico requirió de tres procedimientos: la cirugía de implantación de cánula, la colección de muestras de microdiálisis de libre movimiento, y el procesamiento de estas muestras por el método de electroforesis capilar con detección por fluorescencia inducida por láser (EC-FIL). Esta etapa de la metodología tuvo el fin de analizar la liberación de neurotransmisores durante el protocolo conductual de memoria de reconocimiento de objetos (ORM).

Implantación de cánula para microdiálisis

Los ratones fueron anestesiados con isoflurano (1.25-2.0%) y montados en un aparato estereotáxico con un adaptador para ratón. Durante la cirugía se aplicaron lágrimas artificiales para evitar daño a los ojos. Se removió una pequeña porción de piel de la cabeza de ratón para tener acceso al cráneo y se alineó *bregma* al mismo plano horizontal que *lambda*. Se implantó una cánula guía de microdiálisis (CMA/7; CMA Microdialysis; Kista, Suecia) dirigida hacia la CI (DV -2.75 mm; AP +1.1 mm; ML -3.3 mm) (Figura 4.2 A), y se aseguró con pequeños tornillos y cemento dental. Para evitar que las cánulas guía se taparan se insertaron mandriles. Al finalizar la cirugía se aplicaron antibióticos locales en las heridas (Terramicina y Ketoconazol) y los animales fueron devueltos a sus jaulas para su recuperación. Antes del inicio del entrenamiento conductual, los animales se recuperaron de la cirugía durante 7 días.

¹² Barrera hematoencefálica: barrera permeable con alta selectividad que separa la sangre que está en circulación en todo el cuerpo, del fluido extracelular del cerebro y del sistema nervioso central. Esta está compuesta de células endoteliales cerebrales que forman uniones estrechas.

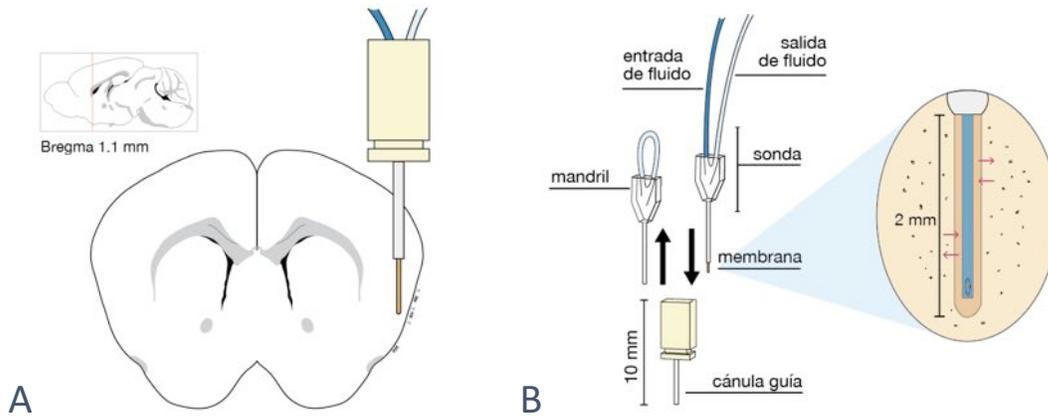


Figura 4.2 Sonda de microdiálisis. **A:** Esquema coronal del cerebro de ratón donde se muestra el sitio blanco de implantación de la cánula guía. Dentro de la cánula se inserta la sonda de microdiálisis, cuya membrana de 2 mm sobresale de la cánula y abarca la región correspondiente a la CI. En la parte superior izquierda se representa una vista lateral del cerebro de ratón y la coordenada de bregma que corresponde al lugar de la cánula. Modificado de Hong Wei para el Allen Institute (2008). **B:** Esquema del método de inserción de la sonda y el mandril en la cánula junto con el mecanismo de difusión de la membrana.

Microdiálisis en libre movimiento

La sonda de microdiálisis CMA/7 (CMA Microdialysis; Kista, Suecia) permite la entrada de solución fisiológica Ringer (solución de $MgCl_2$ 12 mM, NaCl 1.44 M, $CaCl_2$ 17 mM y KCl 48 mM) y la salida de moléculas que se encuentran en el espacio sináptico de la región donde fue implantada la cánula guía. Esto se logra a través de la difusión de la solución Ringer por la membrana semi-permeable de cuprofano de 2 mm (porosidad de 6000 Da) de la sonda, y del principio de gradiente de concentración, lo que resulta en un equilibrio entre los solutos dentro y fuera de la membrana (Figura 4.2 B). Entre los compuestos y moléculas colectados, se encuentra una muestra representativa de los neurotransmisores que son liberados en tiempo real en esa región.

Para infundir solución Ringer en la CI, se utilizaron jeringas para microdiálisis (1 mL) que fueron montadas en una bomba de inyección continua (100 pump CMA Microdialysis; Kista, Suecia). Las jeringas se conectaron con tubería al sistema del brazo para microdiálisis de libre movimiento EICOM Concise Freely Moving System (EICOM; San Diego, E.E.U.U.). A este sistema se conectó la tubería propia de la sonda de microdiálisis, la cual se insertó en las cánulas guía de los animales (Figura 4.3). Para verificar la entrada y salida adecuada de microdializado se programó un flujo de 1.0 $\mu\text{L}/\text{minuto}$ en las bombas de inyección. Una vez verificado lo anterior, se cambió el flujo a 0.25 $\mu\text{L}/\text{min}$ y se mantuvo así hasta finalizar el protocolo. La inserción de la sonda se realizó 45 minutos antes de la fase de adquisición de la prueba conductual de ORM. Este tiempo es necesario para estabilizar el gradiente de solutos del espacio sináptico alrededor de la membrana.

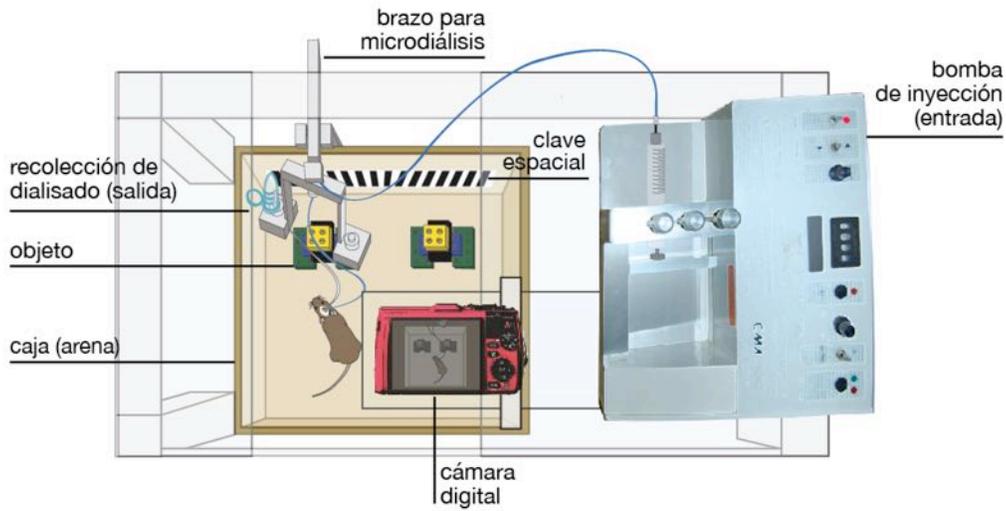


Figura 4.3 Ensamble del protocolo de microdiálisis para la prueba de memoria de ORM. El montaje de este sistema permite analizar la liberación de neurotransmisores en tiempo real mientras los sujetos realizan una prueba conductual.

Una vez finalizado el tiempo de estabilización, se inició la recolección de fracciones de microdiálisis. Las muestras colectadas consistieron en 5 fracciones por sujeto, que fueron recuperadas cada 15 min para acumular un volumen de 4 a 5 μL por fracción (F1-F5). Éstas fueron depositadas en viales conteniendo 1 μL de mezcla antioxidante (Ácido L-ascórbico 25 mM, Na_2EDTA 27mM y ácido acético 1 M) y fueron almacenadas a -70°C hasta su análisis.

Con el fin de establecer una línea basal, las primeras tres fracciones, F1, F2 y F3, se obtuvieron antes del inicio de la fase de adquisición de la tarea (ADQ). La fracción F4 se obtuvo durante la ejecución de la fase, y la fracción F5 se recuperó cuando esta finalizó. Entre la tercera (F3) y cuarta fracción (F4) se colectó la fracción que se denomina tiempo muerto (TM), que dura 29 min 43 s y compensa el tiempo que tarda en pasar el flujo por la tubería de salida hasta su recolección. Esto asegura que la F4 corresponda al tiempo en el que el animal estaba adquiriendo la memoria en la fase de adquisición de ORM. El cálculo del tiempo muerto toma en cuenta la longitud de la tubería de la sonda y del sistema del brazo, así como el volumen interno de ambos y la velocidad del flujo.

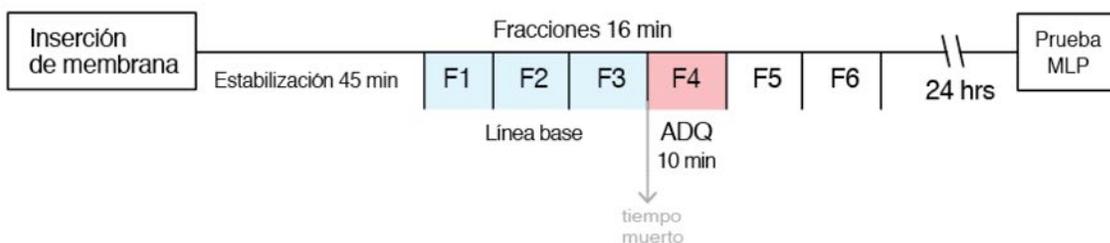


Figura 4.4 Diagrama de la secuencia de recolección de fracciones durante la microdiálisis para la obtención de muestras.

Derivatización química

La detección de aminoácidos y neurotransmisores por el equipo de EC-FIL requiere de una derivatización química. Para llevarla a cabo, se añade el compuesto FQ ([3-(2-furoil)quinolina-2-carboxialdehído], Molecular Probes; Invitrogen, Carlsbad, E.E.U.U.) a la muestra. El FQ reacciona específicamente con aminas primarias para formar conjugados altamente fluorescentes que son excitables por el láser. Esta reacción fue catalizada por cianuro de potasio (24.5 mM) disuelto en amortiguador de boratos (10 mM), y se lleva a cabo a 65°C en oscuridad durante 15 min. Adicionalmente, se agrega el aminoácido O-metil-L-treonina [0.0736 mM (Fluka; St. Louis, E.E.U.U.)] como un estándar interno para verificar la reacción.

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

Las muestras de microdiálisis fueron procesadas a través de la técnica de electroforesis capilar con detección por fluorescencia inducida por láser (EC-FIL) para la determinación de dopamina y otros neurotransmisores, norepinefrina y GABA. Una vez derivatizadas las muestras, éstas fueron procesadas en el equipo de electroforesis capilar P/ACE MDQ (Beckman Coulter; Pasadena, E.E.U.U.). Las muestras son inyectadas a un capilar y se corren en amortiguador de separación [boratos 24.85 mM, dodecilsulfato sódico (SDS) 35.71 mM, beta-ciclodextrina 4.99 mM, urea 10 M y metanol 14.7%; pH: 9.2] a un voltaje de 23 kV. Este amortiguador permite la separación de moléculas de carga neutra por migración diferencial dada por el principio de flujo electro-osmótico¹³.

Mientras la muestra migra por el capilar, pasa por una ventanilla de detección. Las sustancias en el capilar fluorescen por la excitación producida por el láser a la longitud de onda de 488 nm. El detector LIF del equipo mide y registra la fluorescencia emitida por los componentes de la muestra (Figura 4.5). Los datos registrados se transducen como picos en un electroferograma de acuerdo a la concentración del analito y al tiempo de migración. Éstos fueron procesados en el software *32 Karat™* 8.0 (Beckman Coulter; Pasadena, E.E.U.U.). La concentración de dopamina fue determinada al comparar los patrones en los electroferogramas y determinando el área bajo la curva.

¹³ El flujo electroosmótico se refiere a la migración de un líquido (amortiguador) respecto a una superficie cargada (pared del capilar) al aplicar un campo eléctrico. El tiempo de migración de las moléculas contenidas en el amortiguador y que viajan a través del capilar dependerá de su masa y su carga.

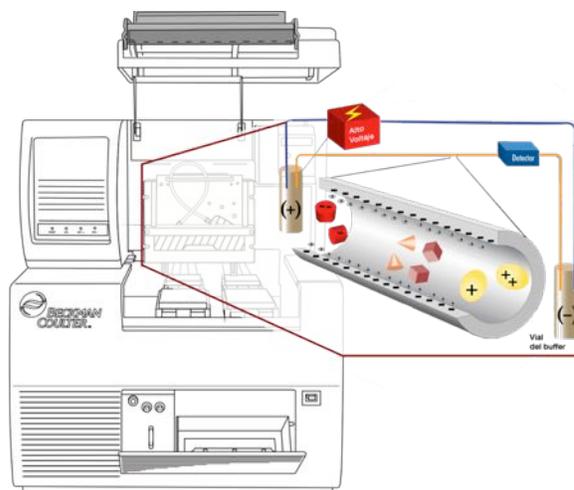


Figura 4.5 Detección de neurotransmisores por medio del equipo de electroforesis capilar. La muestra derivatizada migra por el capilar, donde pasa por la ventana de detección y el detector registra la fluorescencia emitida por los componentes de la muestra que fueron excitados por el láser.

Cuantificación de neurotransmisores

El área bajo la curva obtenida de dopamina, norepinefrina y GABA, se corrigió respecto al volumen que se obtuvo de cada muestra y respecto al área bajo la curva del compuesto de referencia (O-metil-L-treonina). La concentración de dopamina fue obtenida a través de una curva de calibración específica para el neurotransmisor. Esta concentración fue rectificada con el promedio de las fracciones F1, F2 y F3, que indican la concentración basal del neurotransmisor, y se presentó el resultado en valor porcentual. Los datos fueron procesados y calculados en el software *MS Excel* (Microsoft; Redmond, E.E.U.U.).

4.4 Memoria de Reconocimiento de Objetos (ORM)

La tendencia natural de los roedores de tener una conducta exploratoria ante un estímulo novedoso fue reportada por primera vez por Berlyne (1950). A partir de esta observación, Ennaceur y colaboradores (1988) diseñaron la prueba de memoria de reconocimiento de objetos (ORM: Object Recognition Memory) para estudiar la conducta de los roedores cuando distinguen estímulos novedosos de los previamente conocidos. Cuando un roedor identifica un objeto como novedoso, lo explora por más tiempo que el objeto que reconoce como familiar. Se sabe que la memoria de reconocimiento en roedores depende de regiones del lóbulo temporal como la CI y corteza perirrinal (Balderas et al., 2008; Bermudez-Rattoni et al., 2005; De La Cruz, et al., 2008). Este protocolo es una herramienta útil para el estudio del desempeño cognitivo de los roedores, ya que si un animal posee un déficit cognitivo, se verá reflejado en la ejecución de la conducta.

Equipo y objetos

Como arena para el protocolo de ORM y OLM, se emplearon dos cajas cuadradas de madera de 33x33 cm y 30 cm de altura con el piso cubierto de aserrín. A una de las paredes de las cajas se añadió una clave espacial de 28x4 cm con un patrón de rayas verticales blancas y negras de 1.5 cm elevadas a 2 cm del piso de éstas como una clave visual auxiliar. Los objetos que los animales exploraron durante la tarea conductual, consistieron de 2 pares de objetos idénticos con tamaño y volumen similar construidas con bloques de plástico de juguete (LEGO®; Billund, Dinamarca)(Figura 4.6). Cada objeto ya había sido sometido a una prueba de estandarización para evitar que su forma o color indujera una preferencia espontánea sobre otro objeto. Antes del inicio de cada sesión conductual de cada uno de los sujetos, las cajas y los objetos fueron limpiados con etanol al 70% y el aserrín reemplazado para evitar la impregnación de olores.

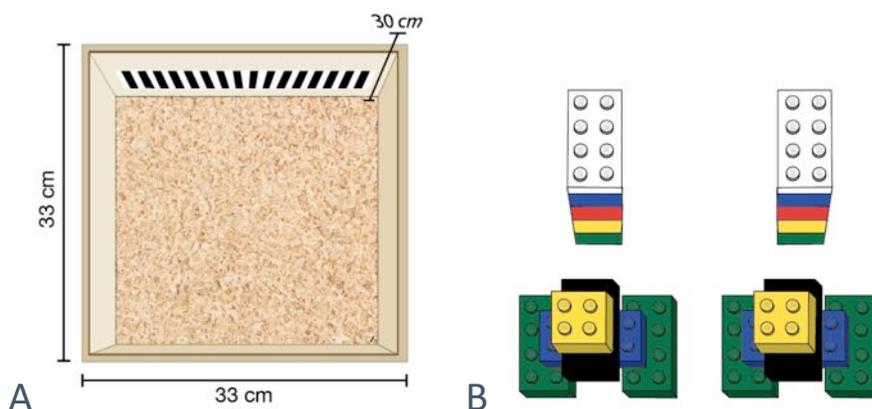


Figura 4.6 Equipo de protocolo de ORM. **A:** Esquema de la arena para la prueba de ORM. **B:** Representación de los pares de objetos utilizados durante la prueba.

Protocolo Conductual

El protocolo de ORM consiste de 5 fases, las cuales se llevan a cabo cada 24 horas (Figura 4.7). Las primeras tres fases consisten en la habituación (HAB1 a HAB3), en la cual durante tres días, los animales fueron colocados en la arena (dentro de las caja) y la exploraron libremente durante 10 min para que se familiarizaran con ella. En la fase de adquisición (ADQ), los ratones exploraron dos nuevos objetos colocados dentro de la arena durante 10 minutos. Después de 24 horas, se realizó la fase de memoria de largo plazo (MLP), en la cual se presentó a los sujetos el mismo objeto de la fase anterior (familiar) y un objeto novedoso, los cuales exploraron durante 10 minutos. Al principio de cada prueba, los animales fueron colocados en el centro de la arena y los objetos son colocados inmediatamente y de forma simultánea. El par de objetos idénticos que se presenta en la fase de ADQ se eligió de forma aleatoria para cada sujeto. Los sujetos tenían contacto directo con los objetos pero los últimos no podían moverse de lugar, y se encontraban

posicionados simétricamente en medio de dos muros opuestos. La HAB3, la ADQ y la fase de MLP fueron grabadas en su totalidad con una cámara montada arriba de la caja para su posterior análisis. Los parámetros medidos fueron el tiempo de exploración (cs) de cada objeto tanto en la fase de ADQ, como en la fase de MLP.

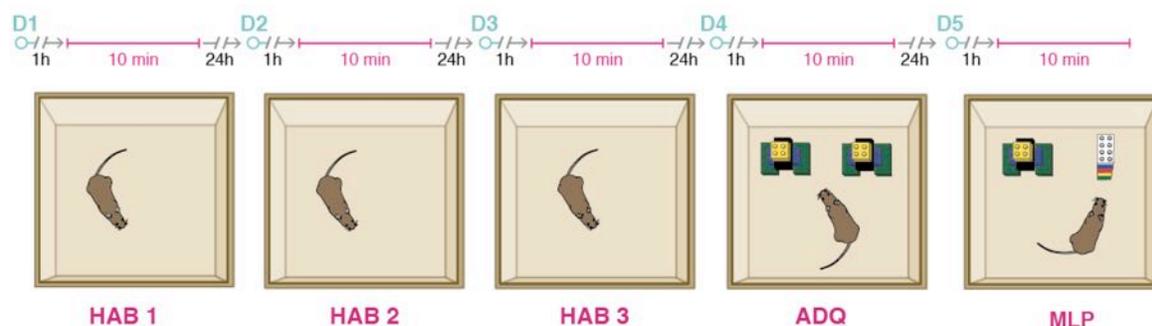


Figura 4.7 Protocolo de ORM. A los animales se les administró el tratamiento (D1-D5) 1 hora antes del inicio de todas las fases de la tarea conductual. Los primeros tres días, los animales fueron habituados a la arena (HAB1-HAB3) durante 10 min. El día de la cuarta dosis (D4), dos objetos iguales fueron presentados a los animales para su exploración (ADQ) por 10 min. 24 horas después se realizó la prueba de MLP, en la cual se presentó un objeto novedoso y un objeto de la sesión anterior por 10 min.

Los criterios establecidos para identificar si el animal estaba explorando los objetos fueron los siguientes: olfateo del objeto con un máximo de 3 cm de distancia del objeto, y contacto directo con el objeto siempre y cuando fuera con la nariz; en ambos criterios es necesario que los ojos del animal estén apuntando hacia el objeto. Si el animal se sienta o tira el objeto no se considera como exploración. De los tiempos de exploración de la ADQ y de MLP se calcula el índice de exploración (IE), que es el cociente del tiempo de exploración de un objeto (O1 u O2), entre el tiempo total de exploración (TTE; O1+O2) (Ecuación 4.1). El IE indica si existe preferencia por explorar un objeto sobre otro. De acuerdo al índice, 1 es preferencia total por un objeto; 0.5 es la media hipotética, es decir, que los objetos se exploraron por igual; y 0 es exploración nula del objeto.

$$IE = \frac{O_1}{(O_1+O_2)} \quad ; \quad IE = \frac{O_2}{(O_1+O_2)} \quad (4.1)$$

Además de la obtención del IE, se registró el tiempo total de exploración (TTE) (cs) para la fase de ADQ y la fase de MLP para cada ratón. El TTE es la suma de la exploración de ambos objetos, y se midió para saber si los animales tratados con el fármaco exploraban los objetos por más tiempo que los animales vehículo.

En esta prueba conductual se llevó a cabo el método de microdiálisis de libre movimiento que se mencionó previamente (sección 4.3, pág.27) para medir la liberación de neurotransmisores en tiempo real. En el último día de habituación (HAB3), los animales

con cánula implantada fueron habituados con un collar conectado al equipo de microdiálisis, siendo estos el brazo de balanceo y una tubería espiral elástica. Para que el tiempo de administración y efecto de la dosis fuera el mismo en todos los grupos y en todas las fases, a los animales con cánula implantada se les insertó la membrana 15 min después de administrar la dosis para que el término del tiempo de estabilización del sistema de microdiálisis no interfiriera y coincidiera con la hora del inicio de la fase de ADQ. Con los animales que no tenían implante de cánula se procedió en la fase de ADQ de la misma forma que en las fases anteriores.

4.5 Memoria de localización de objetos (OLM)

La prueba de memoria de localización de objetos (OLM) fue desarrollada por el equipo de Ennaceur (1988) para evaluar la memoria espacial en roedores. A diferencia de otras tareas conductuales, esta prueba no requiere entrenamiento previo o un reforzador positivo/negativo, y al igual que la prueba de ORM, utiliza la conducta natural exploratoria de los roedores ante un estímulo novedoso. En esta prueba, un roedor identifica unos objetos en una ubicación específica, y si uno de los objetos es movido de su posición después de un determinado periodo de tiempo, el roedor tenderá a explorar por más tiempo el objeto desplazado de su ubicación si tiene recuerdo de su posición previa (Murai et al., 2007). Esta tarea conductual depende mayormente del hipocampo.

Protocolo Conductual

El protocolo de OLM comprende de 2 fases, considerando que los animales ya se encuentran habituados a la arena. El equipo y objetos empleados para este protocolo fue el mismo que el descrito en la prueba de ORM (pág. 31). En la fase de adquisición (ADQ2), los ratones exploraron durante 10 minutos los mismos objetos en la misma ubicación en la que le fueron presentados en la fase de MLP de la tarea de ORM. Después de 24 horas, se realizó la fase de memoria de largo plazo (MLP2), en la cual durante 10 minutos, los ratones exploraron los objetos a los que estaban familiarizados pero uno de los objetos fue desplazado a una nueva ubicación (Figura 4.8). Al principio de cada prueba, los animales fueron colocados en el centro de la arena y los objetos fueron posicionados inmediatamente y de forma simultánea. El objeto que fue desplazado de su ubicación original se eligió de forma aleatoria para cada sujeto. Los sujetos tenían contacto directo con los objetos pero no podían moverse de lugar y fueron posicionados simétricamente en la arena. La ADQ2 y MLP2 fueron grabadas en su totalidad con una cámara montada arriba de la caja para su posterior análisis. Los parámetros medidos fueron el tiempo de exploración (cs) de cada objeto tanto en la fase de ADQ2 como en la fase de MLP2.

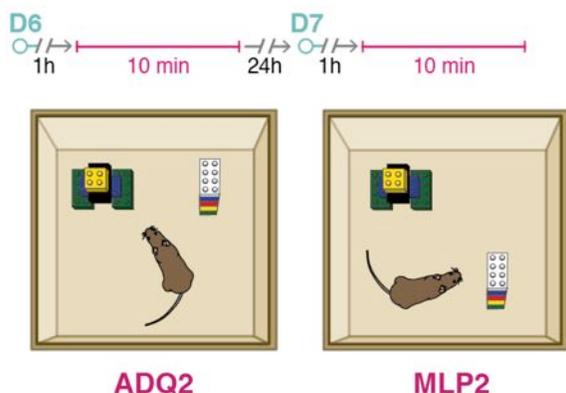


Figura 4.8 Protocolo de OLM. A los animales se les administró el tratamiento (D6-D7) 1 hora antes del inicio las fases de la tarea conductual. El día de la sexta dosis (D6), los mismos objetos presentados en la sesión de MLP de la tarea de ORM fueron presentados a los animales para su exploración (ADQ2) por 10 min. 24 horas después se realizó la prueba de MLP2, en la cual se presentó un objeto en una ubicación novedosa y un objeto en la ubicación familiar por 10 min.

Los criterios para identificar el comportamiento exploratorio del animal fueron los mismos que se emplearon para la prueba de ORM (pág. 31). A partir de los tiempos de exploración de la ADQ2 y de MLP2, se calculó el índice de exploración (IE2), siendo éste el cociente del tiempo de exploración del objeto en la ubicación familiar (UF) o ubicación novedosa (UN), entre el tiempo total de exploración (TTE2; UF+UN) (Ecuación 4.2). De acuerdo al índice, 1 es preferencia total por una ubicación; 0.5 es la media hipotética, es decir, que ambas ubicaciones se exploraron por igual; y 0 es exploración nula de una ubicación.

$$IE2 = \frac{UF}{(UF+UN)} ; IE2 = \frac{UN}{(UF+UN)} \quad \text{Ecuación (4.2)}$$

Además de obtener el IE2, se registró el tiempo total de exploración (TTE) (cs) para la fase de ADQ2 y la fase de MLP2 para cada ratón.

4.6 Laberinto acuático de Morris (MWM)

El laberinto acuático (MWM: Morris Water Maze) es una prueba conductual desarrollada por R. Morris (1984). La característica esencial de este protocolo es que el sujeto es colocado dentro de un tanque circular lleno de agua, del cual puede escapar nadando a una plataforma sumergida oculta a la vista. Con entrenamiento, los animales aprenden a encontrar el emplazamiento de la plataforma utilizando claves visuales que se encuentran fuera del tanque. Si la plataforma se remueve del tanque después de que los roedores fueron entrenados, se espera que los animales naden sobre el área donde se encontraba la plataforma si recuerdan su localización. Esta tarea permite medir la eficiencia de aprendizaje de los animales así como la retención de la memoria espacial basada en un

reconocimiento visual. Este tipo de memoria espacial se procesa principalmente en el hipocampo.

Equipo

La arena del MWM consistió en un tanque circular de plástico de 110 cm de diámetro y 65 cm de altura lleno con 237.6 L de agua (Figura 4.9). El agua se mantuvo entre 20-22°C, se higienizó con un 0.01% de cloro, y fue opacada con pintura blanca lavable para ocultar la plataforma. El tanque se encontraba en un cuarto donde habían cuatro claves visuales, dos consistiendo en imágenes adheridas a un muro contiguo al tanque y otras dos consistiendo en dos personas realizando el experimento (Figura 4.9 A).

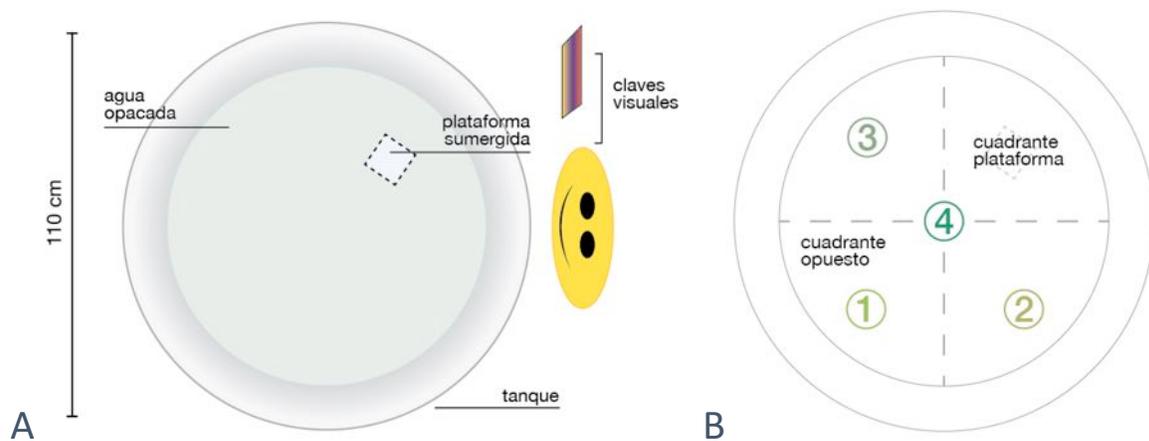
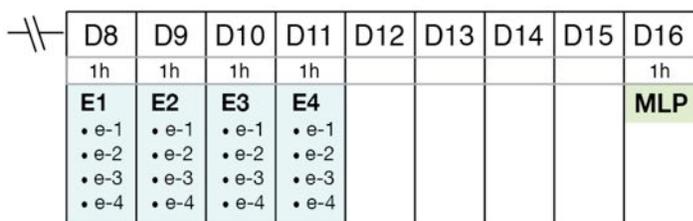


Figura 4.9 Equipo de MWM. A: Esquema de equipo de la prueba de MWM. B: El tanque se dividió en cuatro cuadrantes virtuales, en uno de los cuales se encontraba la plataforma. Los números indican las 4 posiciones en las que los animales fueron colocados en el tanque al inicio de cada ensayo y de forma secuencial.

Entrenamiento y Protocolo

Los ratones fueron entrenados para nadar a una plataforma cuadrada de plástico blanco de 12x12 cm que se encontraba sumergida a una profundidad de 1.5 cm y era invisible para los sujetos. La plataforma se colocó en uno de los 4 cuadrantes virtuales del tanque y se mantuvo en el mismo lugar durante el entrenamiento (Figura 4.9 B). En cada ensayo, el ratón fue colocado en el tanque en una de las cuatro posiciones de inicio de forma secuencial. Una vez en el tanque, cada ratón nadó libremente para encontrar la plataforma sumergida. Si éste fallaba encontrarla en el lapso de 60 segundos, era guiado con una mano hacia la plataforma y se permitía su permanencia en ella durante 10 segundos. Después de cada ensayo, el ratón se removía de la plataforma y descansaba fuera del tanque en una caja con calefacción durante 1 minuto, hasta el comienzo del próximo ensayo. Cada ratón llevó a cabo 4 ensayos por entrenamiento durante 4 días consecutivos (Figura 4.10).



	D8	D9	D10	D11	D12	D13	D14	D15	D16
	1h	1h	1h	1h					1h
	E1	E2	E3	E4					MLP
	• e-1 • e-2 • e-3 • e-4								

Figura 4.10 Calendario del protocolo de MWM. 1 hora después de administrar la dosis correspondiente (D8-D11), los animales tuvieron 4 entrenamientos (E1-E4). Cada entrenamiento tuvo 4 ensayos (e1-e4), cada uno de una duración de 60 segundos en una de las 4 posiciones. 4 días después del E4 y 1 hora después de la D16, se realizó la MLP, la cual duró 60 segundos.

La fase de memoria de largo plazo (MLP) evaluó la retención de la memoria espacial. Esta se llevó a cabo 4 días después del último día de entrenamiento. Antes de la prueba se removió la plataforma y consistió en un nado libre durante 60 segundos para cada sujeto. Los animales fueron monitoreados por una cámara montada en el techo que grabó la totalidad de la pruebas para su análisis. Los parámetros medidos durante la prueba para saber si los animales recordaron la posición de la plataforma fueron: latencia inicial para llegar a la plataforma (s), que mide tiempo que tarda cada animal en tocar el perímetro virtual de la plataforma por primera vez; número de cruces sobre la plataforma (n), que se registra cada vez que el animal cruza mínimo 2 puntos del perímetro virtual de la plataforma; medición del tiempo que pasó el ratón nadando en el cuadrante virtual opuesto a la plataforma (s); y tiempo de nado en el cuadrante de la plataforma (s). Para saber si el tratamiento con el fármaco hacía que los animales nadaran más rápido, se calculó la velocidad media (cm/s), que es el promedio de la velocidad de nado de la trayectoria del animal durante los 60 segundos de la prueba. La velocidad de nado se midió a través del complemento *TrackMate* (Jaqaman et al., 2008) del software *Fiji* (Schindelin et al., 2012).

4.7 Cuantificación del β A

Sacrificio y análisis de tejido cerebral

Los animales fueron letalmente anestesiados con una dosis de 210 mg/kg de pentobarbital para ser perfundidos intracardialmente con solución salina al 9%. Inmediatamente después fueron perfundidos con solución de fijación (paraformaldehído al 4 % y solución amortiguadora de fosfatos 0.2 M con pH de 7.4). Los cerebros fueron extraídos y almacenados en solución de fijación por un mínimo de 24 h, para después almacenarse a una solución de sacarosa al 30% por 48 h como crio-protección. El extremo de las colas se cortó 2 mm y se almacenó a -20°C para genotipificación de los animales. De los cerebros se obtuvieron crio-secciones en un criostato (Leica; Wetzlar, Alemania) de tejido coronales de 40 μm de todo el cerebro, los cuales se mantuvieron en flotación en solución TBS (Trizma base + solución salina 0.9%) 0.1 M. Algunos de los cortes se montaron en portaobjetos y se

tiñeron con violeta de cresilo para detectar el sitio de lesión en ratones sometidos a cirugía de canulación.

El efecto del tratamiento de levodopa sobre la acumulación del β A se evaluó por medio de un análisis semi-cuantitativo de la señal positiva al β A, la cual fue detectada empleando las técnicas de inmunofluorescencia e inmunohistoquímica de diaminobencidina (DAB). Ambas técnicas funcionan con el mismo principio, en el cual es posible detectar una estructura específica (antígeno) de una célula o tejido por medio de un anticuerpo que la reconoce de forma específica. Una vez que el anticuerpo se ha unido a su antígeno, se pueden emplear varios métodos para hacer visible esta interacción, como es el uso de fluoróforos o reacciones químicas, para hacer posible su análisis. Ambas técnicas de inmunohistoquímica se realizaron en flotación en placas de plástico de 24 pozos. En todos los casos, se trataron 2 cortes por pozo y cada corte perteneciendo a un ratón de distinto grupo de tratamiento que el otro. Los cortes fueron elegidos acorde a una distancia de *Bregma* aproximada que concordara con las regiones de interés: para CI y corteza motora fue próximo a *Bregma* 1.145 mm; para el hipocampo y la amígdala se eligieron próximos a *Bregma* -2.055 mm. El anticuerpo utilizado para detectar el β A en tejido fue el 6E10 (Covance, Princeton, E.E.U.U.), siendo reactivo a los residuos 1-16 de amino ácidos del β A. El epítipo¹⁴ se encuentra entre los aminoácidos 3-8 del péptido β A (siendo la secuencia de aminoácidos EFRHDS).

Inmunofluorescencia

El protocolo de inmunofluorescencia se realizó con lavados de solución amortiguadora TBS 0.1 M, TBST (Trizma base 0.1 M y Tritón al 0.1%), y solución de bloqueo [BSA (albúmina bovina sérica) al 5% + TBST]. Para la detección de β A se expusieron epítopes del tejido con ácido fórmico al 88% durante 5 minutos. El anticuerpo primario anti- β A 6E10 (1:500; Covance; Princeton, E.E.U.U.) fue incubado en solución bloqueo durante 20 horas a 4°C en agitación. Al finalizar la incubación, el anticuerpo secundario anti-ratón acoplado al fluoróforo FITC (1:250; GeneTex; Irvine, E.E.U.U.) fue utilizado para reconocer la presencia del anticuerpo primario y revelar la presencia de β A. Al finalizar el protocolo, las secciones tratadas fueron montadas en laminillas silanizadas con medio de montaje para fluorescencia (Dako; Carpintería, E.E.U.U.).

Inmunohistoquímica de DAB

En las inmunohistoquímicas de DAB se utilizó TBS 0.1 M, TBST, y solución de bloqueo para hacer los lavados. La inactivación de peroxidasas endógenas se realizó con peróxido de dihidrógeno al 0.6% y la exposición de epítopes se hizo con ácido fórmico al 70% durante 5 minutos. El anticuerpo primario anti- β A 6E10 (1:500; Covance, Princeton, E.E.U.U.) fue

¹⁴ Epítipo: porción o secuencia de una macromolécula que es reconocida por un anticuerpo.

incubado en solución bloqueo durante 20 horas a 4°C en agitación. Después de la incubación, se hicieron lavados con TBS para añadir el anticuerpo secundario biotilado anti-ratón (1:250; Vector; Burlingame, E.E.U.U.). 1 hora después el anticuerpo secundario se incubó con avidina y peroxidasa con el ABC Kit (Vector; Burlingame, E.E.U.U.) para la formación del complejo biotina-avidina-peroxidasa. Al final se añadió DAB (3,3',4,4'-Bifeniltetramina; Sigma Aldrich; St. Louis, E.E.U.U.), que reaccionó con la peroxidasa para revelar β A. Al terminar el protocolo las secciones tratadas fueron montadas en laminillas tratadas con gelatina y resina de montaje Permout (Fisher Scientific; Waltham, E.E.U.U.).

Procesamiento de imágenes

Para llevar a cabo la cuantificación, se tomaron microfotografías del tejido tratado con inmunohistoquímica e inmunofluorescencia en las regiones de CI, hipocampo, amígdala, y corteza motora en ambos hemisferios del cerebro. Dependiendo de su extensión, se tomaron un número aproximado de microfotografías por cada región para posteriormente ser reconstruidas en una imagen de mayor tamaño y abarcando la región completa. Para considerar a un ratón en la cuantificación, tenía que tener mínimo 2 repeticiones por cada región. En el caso de los cortes tratados con inmunofluorescencia, se tomaron microfotografías con un microscopio confocal de fluorescencia (Olympus; Tokio, Japón) con filtros para el fluoróforo FITC, a un aumento de 30x y una apertura confocal de 2.5x. Para los cortes tratados con DAB, se tomaron microfotografías con un microscopio óptico (Zeiss; Jena, Alemania) con una cámara montada a un aumento de 20x.

Las imágenes obtenidas por ambos microscopios fueron procesadas con el software *Fiji* (Schindelin et al., 2012). Las regiones de interés fueron reconstruidas en mosaicos y recortadas para permitir el análisis de un área homogénea y que resultara comparable entre distintos sujetos. El área elegida para cada región fue: 1800x940 μ m para CI, 1300x1300 μ m para corteza motora, y 700x900 μ m para amígdala. Para hipocampo, el análisis se dividió en 2 subregiones: 2300x700 μ m para la región de CA1 y 900x600 μ m para CA3 700x700 μ m. Una vez recortadas, se realizó un conteo de partículas positivas a señal del β A utilizando *Analyze Particles*, software complemento de *Fiji*. Esto se llevó a cabo generando imágenes que son máscaras en blanco y negro de las regiones de interés, en las cuales se registran las áreas oscuras de la imagen que corresponden a señal inmunoreactiva positiva a β A. Esta señal es cuantificable en forma de partículas y su consideración como señal positiva o negativa depende de su valor umbral gráfico (threshold), valor de circularidad, y tamaño de la partícula. Para todas las fotografías, se fijaron los mismos parámetros de análisis de acuerdo a la región de interés.

Genotipificación

Para verificar que los sujetos utilizados en el experimento fueran transgénicos, se realizó una genotipificación por medio de PCR¹⁵. Las colas obtenidas de los ratones fueron maceradas con solución de lisis Alcalina (250 μ L de NaOH 10N + 40 μ L EDTA 0.5 M + 100 mL de H₂O) y se incubaron 1 hora a 95°C. Después se añadió solución de neutralización [4 mL de Tris HCl 40mM + 100 de H₂O] y se centrifugaron las muestras (4°C a 12500 rpm por 2 min). A las muestras se les añadió la mezcla de primers con los reactivos correspondientes (Coral Load + dNTPs + Taq Pol + H₂O) y se colocaron en el termociclador de PCR para su procesamiento. La secuencia de los primers¹⁶ utilizados se muestra en la Tabla 4.1. Posteriormente, a las muestras resultantes del PCR se les añadió la solución de digestión [solución amortiguadora NEB 10x + BSTII (enzima de restricción) + H₂O] durante 2 h a 37°C.

Elemento de DNA	Gen que identifica	Secuencia del primer
5TAU REV	Tau humana	5' TCCAAAGTTCACCTGATAGT 3'
APPInternal 5'	APP humano	5' GCTTGCACCAGTTCTGGATGG 3'
Thy 12.4	Elemento regulatorio Thy 1.2	5' GAGGTATTCAGTCATGTGCT 3'
PS1k 13	Presenilina mutada	5' CACACGCACACTCTGACATGCACAGGC 3'
PS1k 15	Presenilina mutada	5' AGGCAGGAAGATCACGTGTTCCAAGTAC 3'

Tabla 4.1 Secuencia de los primers para PCR.

Los productos de la digestión fueron identificados por medio de electroforesis en un gel de agarosa. Se cargaron 10 μ L de cada muestra por carril de gel y fueron corridas en solución amortiguadora TBE 0.5 M a 45 V durante 1 hora. El gel fue teñido con bromuro de etidio para marcar los sitios de presencia de DNA. Los genes *APP* y *MAPT* fueron observados en el gel en los pesos moleculares de 500 y 350 y PS1 300 y 250.

4.8 Análisis estadístico

En el protocolo de ORM y OLM, se utilizaron pruebas *t de student* para comparar los IE e IE2 en las fases de ADQ y MLP y ADQ2 y MLP2. En la fase de ADQ e ADQ2, los animales que tuvieron un índice igual a 0 o 1 para alguno de los objetos fueron excluidos (ADQ, n=1; ADQ2, n=0), considerando que se requiere la exploración de ambos objetos para posteriormente poder hacer distinción de la novedad/familiaridad. Los ratones que tuvieron un IE o IE2 mayor a 0.7 en la fase de ADQ/ADQ2 fueron excluidos (ADQ, n=2; ADQ2, n=1), ya que presentan preferencia por un objeto idéntico a otro y es un fenómeno

¹⁵ PCR significa reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction). Esta es una técnica de biología molecular cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de DNA específico, por medio de un primer y una enzima que lo multiplica. La gran cantidad de copias facilita la identificación del fragmento de DNA deseado.

¹⁶ Primer (cebador): hebra corta de ácidos nucleicos que sirve como punto de partida para la síntesis de DNA.

estadísticamente fuera de la media. Los resultados son presentados en gráficas de barras. Para el análisis de los tiempos totales de exploración (TTE) en la fase de ADQ/ADQ2 y MLP/MLP2, se utilizó la prueba de ANOVA de 1 vía con prueba post hoc Bonferroni.

Los cambios de liberación de dopamina, norepinefrina y GABA durante la fase de ADQ medidos durante el protocolo de ORM (F1 a F5), fueron analizados con ANOVAs de un factor con cinco niveles de medidas repetidas y análisis post-hoc para múltiples comparaciones Fisher *Least Significant Difference* (LSD). Los resultados están presentados en una gráfica lineal y se expresan en porcentaje de liberación basal.

Para el análisis de la prueba de MWM, se realizó una ANOVA de 2 vías con medidas repetidas para analizar la relación entre el tratamiento (Levodopa o vehículo) y la latencia para llegar a la plataforma (s) durante los días de entrenamiento, con prueba post hoc Bonferroni. Este análisis se hizo con el promedio de ensayos por día (por entrenamiento) y está representado en gráficas lineales. Los análisis del número de cruces, la latencia a plataforma en la prueba de MLP, el tiempo en cuadrante de plataforma, tiempo en cuadrante opuesto y velocidad de nado fueron analizados con pruebas *t de student* y están expresados en gráficas de barras.

La cuantificación de la acumulación del βA fue analizada por pruebas *t de student*, donde los resultados están expresados en gráficas de barras y se compara el número de somas positivas a βA entre tratamientos en las regiones de CI, hipocampo (CA1 y CA3), amígdala y corteza motora.

Todos los análisis estadísticos se hicieron con el software *GraphPad Prism 5.0* (GraphPad; La Jolla, E.E.U.U.) y *StatView* (Abacus Corp.; California, E.E.U.U.), y la recolección de datos con *MS Excel* (Microsoft; Redmond; E.E.U.U.).

5 Resultados

5.1 Efecto del tratamiento con levodopa en los niveles de dopamina en CI durante la prueba de ORM

Para determinar si la administración de levodopa produce un incremento en los niveles de dopamina en CI durante la fase de ADQ del ORM, se analizó la concentración extracelular de dopamina en las muestras de microdiálisis mediante EC-FIL. Observamos un incremento significativo en el porcentaje de liberación de dopamina durante la exploración de los objetos, en el grupo tratado con levodopa (n=4) respecto al grupo vehículo (n=4) ($F_{(1,4)}=6.575$ * $p=0.0167$) (Figura 5.1).

Al realizar un análisis post-hoc con la prueba Fisher *Least Significant Difference* (LSD), se reveló que el porcentaje de liberación de dopamina en los animales tratados con levodopa incrementa de manera significativa durante la fracción que corresponde a la exploración durante la fase de ADQ respecto a la línea base (F3-F4, * $p=0.0140$) y a la fracción posterior (F4-F5, * $p=0.030$). Estos resultados indican que la administración de levodopa restaura la liberación de dopamina en CI de los ratones 3xTg-AD durante la ADQ del ORM.

El análisis de la liberación de los neurotransmisores norepinefrina (NE) ($F_{(1,4)}=1.160$, $p=0.2922$) y GABA ($F_{(1,4)}=0.625$, $p=0.4371$) mostró que la concentración extracelular de dichos neurotransmisores no cambia durante la fase de adquisición del ORM.

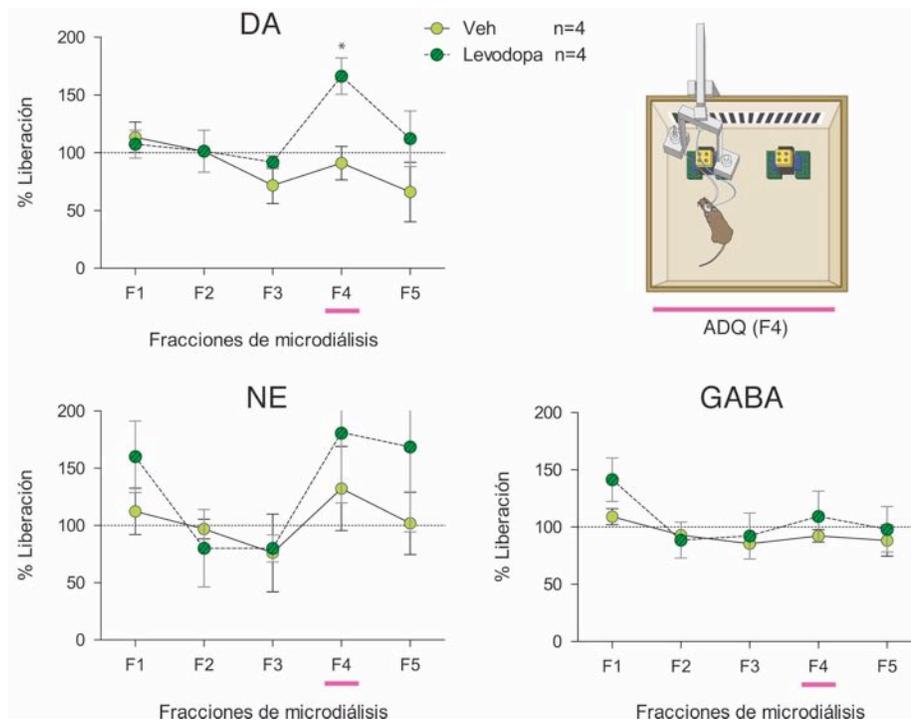


Figura 5.1 La administración de levodopa incrementa los niveles de dopamina. Gráficas que expresan el respectivo porcentaje de liberación de dopamina (DA), norepinefrina (NE), y GABA en cada fracción de microdialisis (F1-F5). La F4 corresponde al tiempo en que el animal está en la fase de adquisición de la tarea de ORM. Los animales tratados presentan un incremento significativo de liberación de dopamina respecto al grupo vehículo (* $p=0.0167$).

5.2 Efecto del tratamiento con levodopa sobre la memoria de reconocimiento en el modelo 3xTg-AD

El efecto del tratamiento de levodopa sobre la memoria de reconocimiento de los ratones fue evaluado a través del protocolo de ORM. Se midieron los tiempos de exploración de los sujetos y se obtuvieron los IE para la fase de ADQ y la fase de MLP. En la fase de ADQ, encontramos que los ratones de ambos tratamientos [(levodopa (LD); vehículo (Veh))] exploraron los objetos idénticos de manera similar y no hubo diferencia significativa entre el IE de éstos ($n_{veh}=11$, $p=0.4369$; $n_{LD}=16$, $p=0.6523$). Los índices obtenidos indican que los ratones no mostraron preferencia por alguno de los objetos. En la MLP, se encontró que el grupo tratado con levodopa pudo distinguir al objeto familiar del objeto novedoso, contrario al grupo vehículo, que exploró ambos objetos por igual e indica no hubo detección de un objeto novedoso ($n_{veh}=11$, $p=0.6176$; $n_{LD}=16$, *** $p<0.0001$). Los datos obtenidos confirman que los ratones 3xTg-AD de 11 y 12 meses presentan un déficit en la memoria de reconocimiento que puede ser restaurado con la administración de levodopa (Figura 5.2).

Los tiempos totales de exploración (TTE) fueron analizados para saber si había alguna diferencia en el tiempo de exploración entre los tratamientos. Los resultados indicaron los sujetos tratados con levodopa tuvieron variaciones significativas en el TTE entre la ADQ y MLP ($F_{(15,15)} = 6.502$, $p = 0.0008$). Al realizar una prueba U de Mann-Whitney no se halló una interacción significativa entre las variables ($n_{LD}=7$, $p=0.1935$). En el grupo vehículo no hubo diferencias significativas entre el TTE de la fase de adquisición y memoria de largo plazo ($n_{veh}=11$, $p= 0.1091$; $n_{LD}=16$, $p=0.1190$), así como no se encontraron diferencias en el tiempo al comparar las fases entre tratamientos (ADQ, $p=0.5333$; MLP, $p=0.8002$) (Figura 5.2)., lo que indica que la levodopa no produce un cambio en el comportamiento de los animales respecto al tiempo de exploración de los objetos.

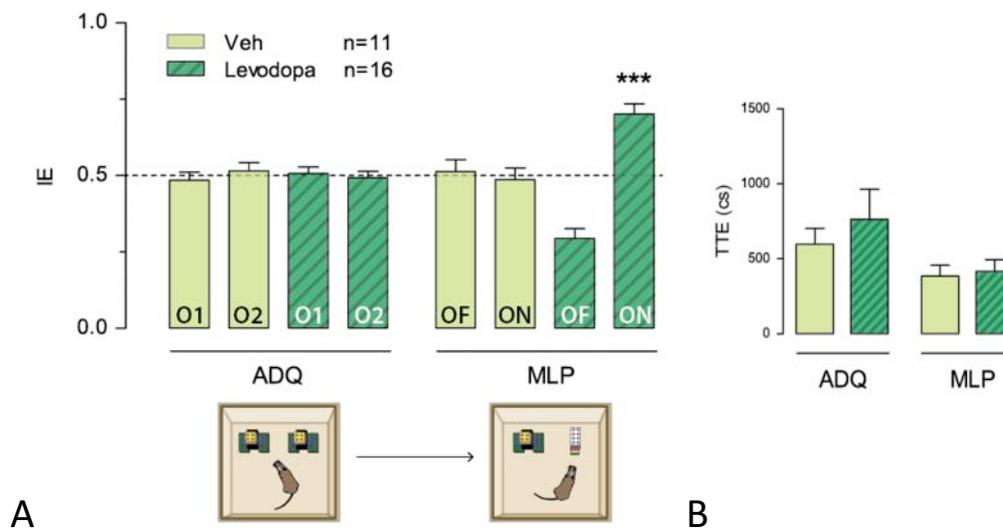


Figura 5.2 La administración de levodopa mejora la memoria del reconocimiento de objetos (ORM). **A:** Índice de exploración (IE) durante la fase de adquisición (ADQ) y memoria de largo plazo. En la ADQ, los animales exploraron 2 objetos idénticos (O1 y O2) durante un tiempo similar. Durante la prueba de MLP, los ratones tratados con levodopa (n=16) distinguieron el objeto novedoso (ON) del objeto familiar (OF) (** $p < 0.0001$), a diferencia de los animales no tratados (Veh; n=11). En la gráfica, cada barra representa el IE de cada objeto, y la línea punteada representa la media hipotética. Los datos se presentan en promedio \pm error estándar. **B:** Gráfica de Tiempo total de exploración (TTE) expresado en centésimas de segundo (cs) de ambos grupos en las fases de ADQ y MLP.

Estos resultados comprueban que el tratamiento sub-agudo con levodopa mejora el desempeño de los ratones 3xTg-AD en una tarea de memoria de reconocimiento, lo que quiere decir que la restauración de la actividad dopaminérgica por medio de este fármaco tiene efectos observables a nivel conductual y de relevancia cognitiva.

5.3 Efecto del tratamiento con levodopa en la ejecución conductual de la memoria espacial en el ratón 3xTg-AD

Memoria de ubicación de objetos (OLM)

La primera prueba conductual para evaluar si la administración de levodopa producía cambios en la ejecución de la memoria espacial fue OLM. Los tiempos de exploración de los ratones fueron registrados para obtener el IE2 para la fases de ADQ2 y MLP2. En primera fase se encontró que los animales de ambos tratamientos exploraron los objetos durante tiempos similares y no se halló diferencia significativa entre el IE2 de éstos ($n_{veh}=7$, $p=0.3796$; $n_{LD}=7$, $p=0.4134$), lo cual indica que no hubo preferencia por alguno de los objetos. En la MLP2, se observó que ambos grupos exploraron el objeto en la ubicación familiar y el objeto en la ubicación novedosa por igual, ($n_{veh}=7$, $p=0.7539$; $n_{LD}=7$, $p=0.7722$) (Figura 5.3).

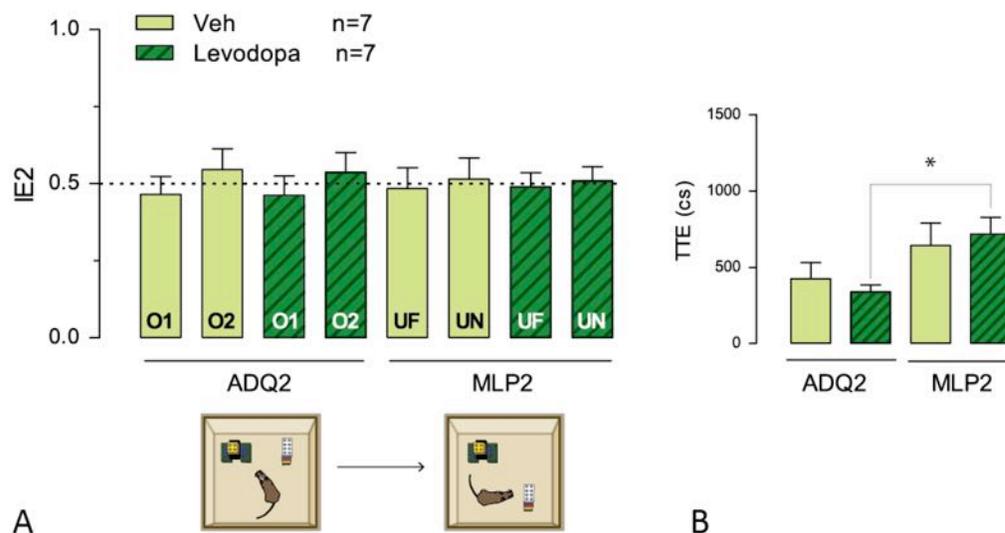


Figura 5.3 El tratamiento con levodopa no modifica la memoria de ubicación de objetos (OLM).

A: Índice de exploración (IE2) durante la fase de adquisición (ADQ2) y memoria de largo plazo (MLP2). En la ADQ2, los animales exploraron en tiempo similar los mismos objetos (O1 y O2) presentados en la fase de MLP de ORM. Durante la prueba de MLP2, se encontró que ninguno de los grupos (Levodopa, $n=7$; Veh, $n=7$) exploró por más tiempo alguno de los objetos. En la gráfica, cada barra representa el IE2 de cada objeto, y la línea punteada representa la media hipotética. Los datos se presentan en promedio \pm error estándar. **B:** Gráfica de tiempo total de exploración (TTE) expresado en centésimas de segundo (cs) de ambos grupos en las fases de ADQ2 y MLP2. Los animales tratados con levodopa mostraron un incremento significativo en el tiempo de exploración en la fase de MLP2 ($*p=0.0175$) respecto a la fase de ADQ2.

Para conocer si había diferencia entre el tiempo de exploración entre tratamientos, se realizó un análisis adicional de los tiempos totales de exploración (TTE) tanto para la fase de ADQ2 como MLP2 del protocolo conductual. Los resultados arrojaron que los animales

tratados con levodopa presentaron variaciones significativas en el TTE entre la ADQ2 y MLP2 ($F_{(6,6)}=5.968$, $p=0.0471$). Se realizó una prueba U de Mann-Whitney y se encontró una diferencia significativa entre las variables ($n_{LD}=7$ * $p=0.0175$). El grupo vehículo no tuvo diferencias en la exploración ($n_{veh}=7$, $p=0.2531$), y no se encontraron diferencias en TTE al comparar las fases entre tratamientos (Figura 5.3). Los resultados sugieren que el tratamiento sub-agudo con levodopa no produce una mejora significativa en el IE2 durante la tarea de OLM en los ratones 3xTg-AD, pero los ratones tratados con levodopa incrementan su exploración durante la fase de MLP de la prueba de OLM.

Laberinto acuático de Morris (MWM)

Para determinar el efecto del tratamiento en esta tarea de memoria espacial, se midió el tiempo que le tomó a cada sujeto en llegar a la plataforma en cada ensayo y se realizó un promedio de todos los ensayos por cada día de entrenamiento. Los resultados obtenidos indican que el tratamiento con levodopa no mejora el aprendizaje y ejecución de la tarea conductual, al no existir una diferencia significativa entre tratamientos ($n_{veh}=10$, $n_{LD}=11$) en el tiempo medido de latencia a la plataforma ($F_{(1,19)}=2.39$, $p=0.1387$). Ambos grupos mostraron una curva de aprendizaje similar, en la cual se observa una tendencia que con el transcurso de los ensayos y días de entrenamiento, hay una disminución significativa del tiempo requerido para llegar a la plataforma ($F_{(3,57)}=21.33$, $p<0.0001$) (Figura 5.4). Después de los 4 días de entrenamiento, se realizó la prueba de MLP. Los animales que no disminuyeron el tiempo de latencia a la plataforma en los días de entrenamiento fueron excluidos ($n=1$). Dos animales ($n=2$) con tratamiento vehículo murieron antes de la realización de la prueba de MLP, por lo que sus datos también fueron excluidos.

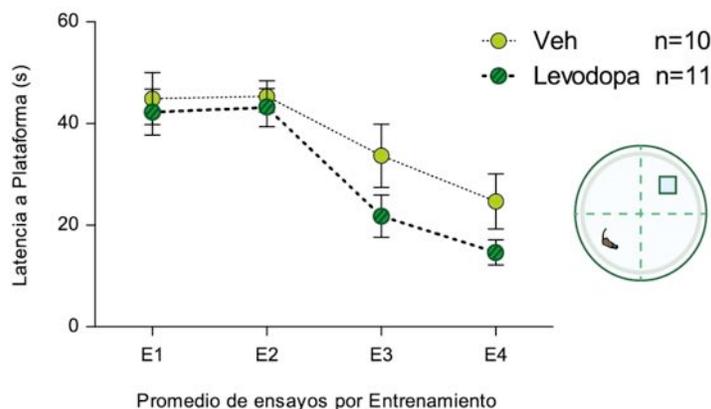


Figura 5.4 El tratamiento con levodopa no tiene efecto en el aprendizaje del MWM. Latencia a plataforma(s) en relación a entrenamientos. Los animales fueron entrenados para nadar a la plataforma sumergida en 4 entrenamientos (E1-E4). Cada entrenamiento representa un día y es el promedio de 4

La prueba de MLP evaluó si los sujetos recordaban la localización de la plataforma. Para ello, la plataforma se removió durante toda la sesión, consistiendo de un nado libre que tuvo una duración de 60 segundos para cada sujeto (Figura 5.6). Durante ese tiempo, se midieron 4 parámetros que ayudaron a comparar el nivel de retención de memoria espacial: latencia inicial para llegar a la plataforma (s), número de cruces sobre la plataforma (n), tiempo en el cuadrante virtual opuesto a la plataforma (s), y tiempo nado en el cuadrante de la plataforma (s). Estos parámetros fueron comparados entre los grupos vehículo y con tratamiento con levodopa (Figura 5.5). Al realizar el conteo del número de cruces sobre el perímetro de la plataforma, se encontró que no hubo diferencias entre tratamientos ($n_{veh}=10$, $n_{LD}=11$; $p=0.4670$). El tiempo de latencia a la plataforma fue comparado entre los grupos y no se observaron diferencias significativas ($p=0.1057$). Tanto en tiempo de nado en el cuadrante de ubicación de la plataforma ($p=0.6162$), como en el tiempo de nado en cuadrante opuesto a la plataforma ($p=0.4347$), no se observó que los sujetos tratados con levodopa mejoraran su desempeño respecto al grupo vehículo. El tratamiento con el fármaco tampoco tiene influencia en la velocidad de nado, ya que no se encontró distinta entre los grupos ($p=0.3188$). Los resultados observados muestran que el tratamiento sub-agudo con levodopa no produce una mejora significativa en la ejecución de la tarea de MWM.

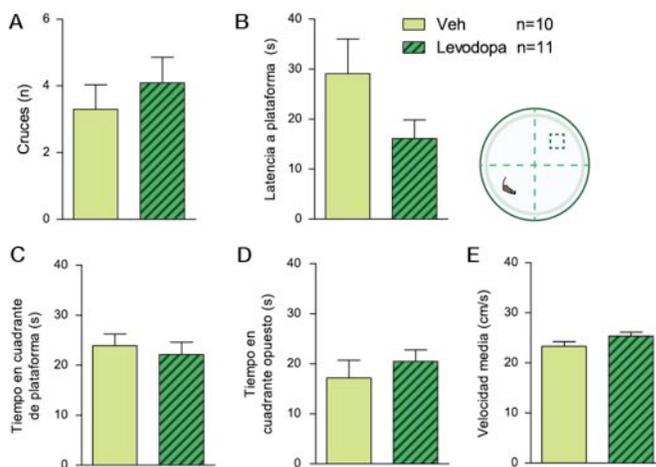


Figura 5.5 El tratamiento con levodopa no tiene efecto en la prueba de MLP del MWM (gráficas A-E).

A: Número de cruces sobre la plataforma en la prueba de MLP. **B:** Latencia a plataforma en MLP. **C:** Tiempo de nado en cuadrante correspondiente a la ubicación de la plataforma. **D:** Tiempo de nado en cuadrante opuesto a plataforma. **E:** Velocidad media. La gráfica muestra el promedio de la velocidad de toda la trayectoria de nado durante la MLP.

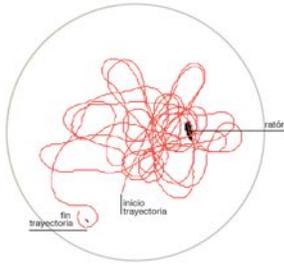


Figura 5.6. Ejemplo de la trayectoria que realizó un ratón en la prueba de MLP detectada por el software *Fiji*.

5.4 Efecto del tratamiento con levodopa sobre la acumulación del β A

El análisis histológico permitió evaluar si la administración de levodopa disminuía la acumulación del β A en el cerebro de los animales en las regiones CA1 y CA3 de hipocampo, CI, corteza motora, y amígdala. Las regiones de interés fueron elegidas por su relevancia en procesos de memoria, incluyendo la memoria de reconocimiento y memoria espacial. De acuerdo a cada región, las secciones de cerebro de los ratones se acotaron acorde a una distancia de bregma aproximada y fueron tratados con inmunofluorescencia e inmunohistoquímica de DAB para la detección del β A.

Las microfotografías tomadas del tejido tratado con inmunofluorescencia demostraron la presencia del β A en ambos grupos experimentales y en todas las regiones analizadas (Figura 5.7). Tanto en las inmunofluorescencias como en las inmunohistoquímicas de DAB, la detección del β A fue casi exclusivamente β A intraneuronal, no habiendo una detección notoria de placas seniles por el anticuerpo utilizado.

Para determinar si existían diferencias en la acumulación del β A entre tratamientos, se procesaron las imágenes de máscara de las fotografías del tejido tratado con inmunohistoquímica de DAB y se cuantificaron el número de somas inmunoreactivas a señal del β A. Dependiendo de su extensión, se tomaron un número aproximado de microfotografías por cada región (12 para la corteza, 12 para el hipocampo y 4 para la amígdala) y por cada hemisferio, y fueron reconstruidas en una imagen de mayor tamaño y abarcando la región completa. Los ratones que no obtuvieron el mínimo de 2 reconstrucciones y repeticiones por región, fueron excluidos de la cuantificación. Los resultados mostraron que en la región de CI hay una disminución significativa en la acumulación del β A en los ratones tratados con levodopa respecto a los vehículo ($n_{veh}=8$, $n_{LD}=8$; *** $p=0.0008$), y en CA1 se observa una tendencia similar al presentar una diferencia significativa de presencia del β A entre tratamientos ($n_{veh}=8$, $n_{LD}=8$; * $p=0.0493$). En las regiones de corteza motora ($n_{veh}=8$, $n_{LD}=9$; $p=0.2071$), CA3 ($n_{veh}=8$, $n_{LD}=8$;

$p=0.1888$), y amígdala ($n_{veh}=7$, $n_{LD}=7$; $p=0.7432$) no se encontraron diferencias significativas entre los grupos. Las imágenes y gráficas del análisis están representados en la Figura 5.8. Aunque no tiene un efecto global, estos datos demuestran que el tratamiento sub-agudo con levodopa disminuye la acumulación del βA intraneuronal.

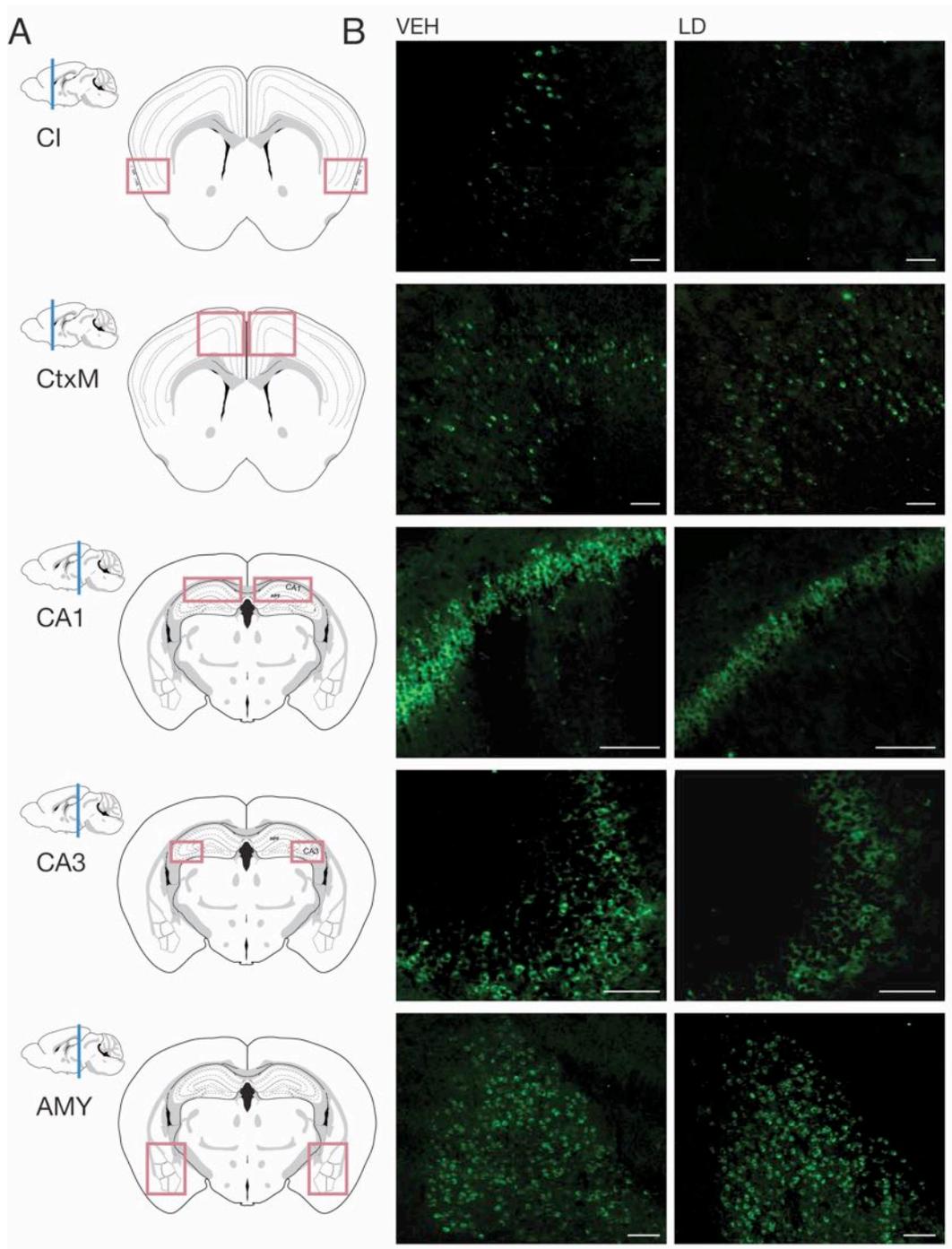


Figura 5.7 Acumulación de β A en los ratones 3xTgAD. A: Las regiones elegidas para el análisis de la acumulación de β A son corteza insular (CI), corteza motora (CtxM), CA1 y CA3 en hipocampo, y amígdala (AMY). Modificado de Hong Wei para el Allen Institute (2008). B: Inmunofluorescencias representativas de β A de los grupos vehículo (VEH) y levodopa (LD) de cada región. La barra de escala en cada imagen representa 100 μ m.

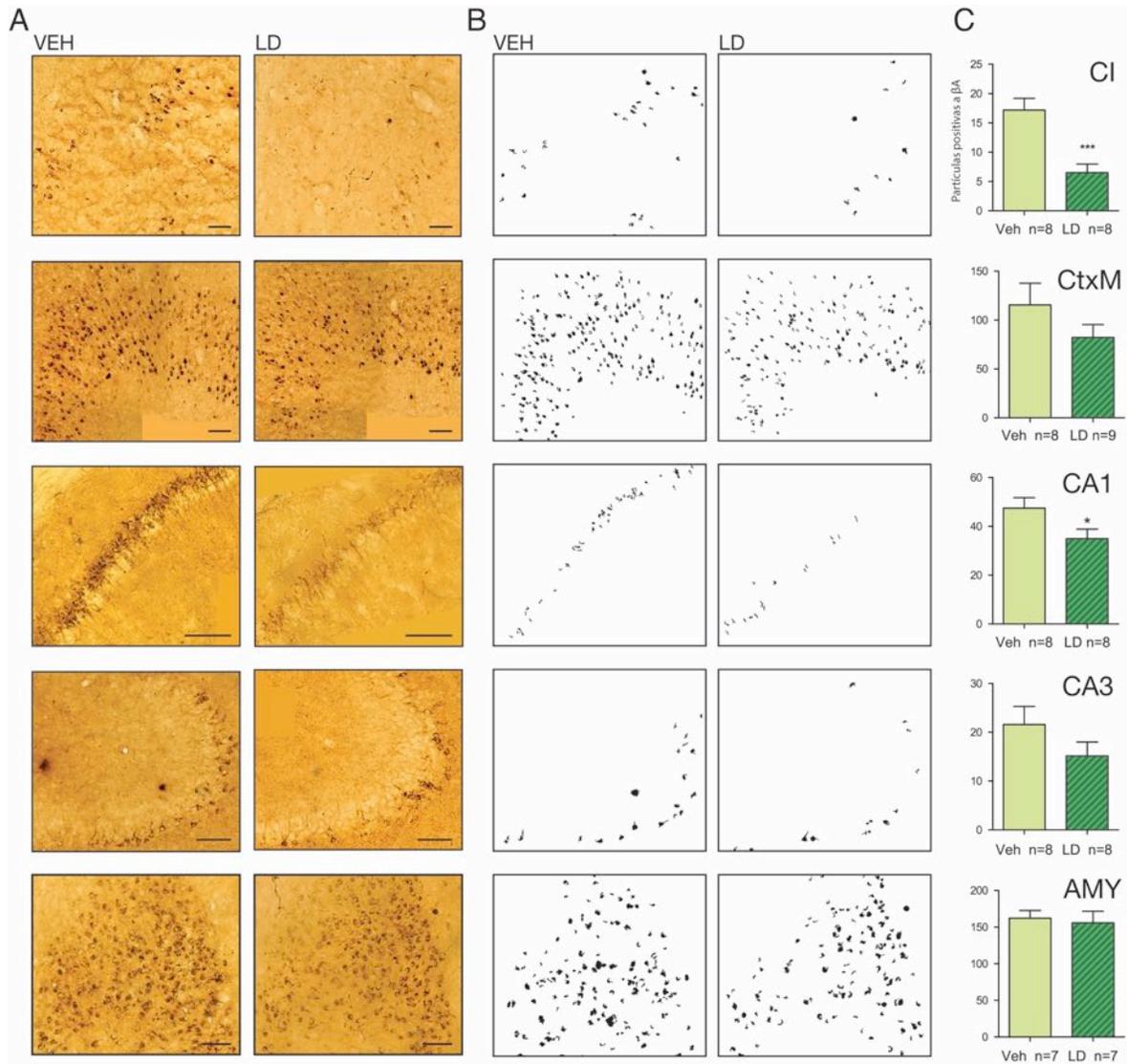


Figura 5.8 El tratamiento con levodopa disminuye la acumulación de β A en CI e hipocampo. A: Microfotografías representativas de la inmunohistoquímica con DAB en las regiones de CI, CtxM, CA1, CA3 y AMY de los grupos vehículo (VEH) y levodopa (LD). La barra de escala en cada imagen representa 100 μ m. B: Máscaras resultantes de la cuantificación de partículas positivas a β A en las microfotografías. C: El análisis estadístico de los resultados de la cuantificación mostró una disminución significativa en la acumulación de β A en los sujetos tratados con levodopa (LD), en las regiones de CI (**p=0.0008) y CA1 (*p=0.0493) respecto al grupo vehículo.

6 Discusión

6.1 Efecto de la administración levodopa sobre los niveles de dopamina y la memoria de reconocimiento

Con base en los resultados obtenidos de liberación de dopamina durante el protocolo de ORM, la administración de levodopa restaura la liberación de este neurotransmisor en la CI durante la fase de adquisición de la tarea de ORM. Este hallazgo va de acuerdo a lo reportado por Guzmán y colaboradores (2012), quienes encuentran que un tratamiento agudo con un inhibidor de recaptura de dopamina, restaura la liberación de dopamina en la CI durante el ORM y mejora la memoria a largo plazo. En este caso el tratamiento con levodopa con la dosis administrada está incrementando la síntesis de dopamina a un nivel fisiológicamente relevante. La CI es una región sensible a la dopamina, ya que tiene una alta densidad de fibras dopaminérgicas que principalmente surgen de VTA y *substantia nigra* (SNPc) (Ohara et al., 2003). Aunque el incremento sólo fue observado en la región de la CI, la administración diaria vía i.p. estaría produciendo un incremento de los niveles de dopamina en un nivel sistémico (Bredberg et al., 1994).

El déficit en los niveles basales de dopamina encontrados en espacio extracelular de la CI del ratón 3xTg-AD viejo, conlleva a que a pesar que las neuronas dopaminérgicas reciben un estímulo, no responderían a este óptimamente. Esto estaría ocurriendo al carecer una concentración de neurotransmisor necesaria para provocar la activación de los receptores dopaminérgicos en las neuronas post sinápticas, e inducir la respuesta requerida para la ejecución de tareas cognitivas y el establecimiento de trazos de memoria. En este trabajo, la levodopa podría estar aminorando las deficiencias de dopamina en el ratón 3xTg-AD a través de la restitución de dopamina almacenada en las neuronas presinápticas. La levodopa, a diferencia de agonistas dopaminérgicos, produce liberación fásica de dopamina, la cual abre una ventana de estimulación dopaminérgica mayor y permite la liberación de dopamina en diferentes fases de los procesos de memoria, como es la adquisición de una tarea de memoria y su consolidación a largo plazo. Este tipo de liberación ha demostrado ser crucial para un aprendizaje efectivo (Breitenstein et al., 2006; Fiorillo, 2004). Cabe añadir que la levodopa permite llevar a cabo un tratamiento a largo plazo que restituya los niveles de dopamina constantemente, los que se encuentran alterados en el envejecimiento y en la EA. Lo reportado en este trabajo indica que el

tratamiento sub-agudo con levodopa es efectivo restaurar la liberación de dopamina en el ratón 3xTg-AD, lo cual tiene relevancia terapéutica para la EA en niveles fisiológicos y cognitivos.

Los animales 3xTg-AD tratados con levodopa mejoraron su desempeño en la prueba de ORM respecto a los animales vehículo. En trabajos anteriores ya ha sido reportada la activación de receptores dopaminérgicos como un evento necesario para la formación de la memoria de reconocimiento a largo plazo en las cortezas prefrontal y perirrinal en ratas (Balderas et al., 2013; de Lima et al., 2011) y en ratones (Nagai et al., 2007). Al administrar el antagonista dopaminérgico SCH23390 en la corteza perirrinal en ratas, se inhibe la actividad del receptor D_1 y se altera la formación de memoria de largo plazo (Balderas et al., 2013). Esto quiere decir que el incremento de niveles de dopamina inducido por la administración sub-aguda de levodopa, podría estar incrementando la probabilidad de la activación de receptores sensibles a la dopamina, resultando en una mejora cognitiva.

La activación de los receptores de dopamina estaría ocurriendo en la corteza prefrontal, la corteza perirrinal, y en la CI, que fue la región monitoreada en este trabajo. Varios trabajos de nuestro laboratorio han demostrado la relevancia que tiene la CI en la memoria de reconocimiento, ya que su bloqueo farmacológico impide la correcta ejecución de tareas asociadas a este tipo de memoria (Balderas et al., 2008; Bermudez-Rattoni et al., 2005). También se ha mostrado que el incremento de los niveles de dopamina en esta región ocurre durante la presentación de un estímulo novedoso, y además es requerido para la formación de memoria a largo plazo (Guzmán-Ramos et al., 2010, 2012). En el caso de este trabajo, la presentación de un estímulo novedoso corresponde a la fase de adquisición del protocolo de ORM, en la cual se demostró que los animales tratados mostraron liberación de dopamina en la CI en respuesta a la exploración de los objetos novedosos. Por lo tanto, la restauración de los niveles de dopamina sobre su nivel basal en la CI de los ratones 3xTg-AD se atribuye al tratamiento con levodopa. Este tratamiento también estaría teniendo efecto en la consolidación de esta memoria, lo cual se reflejó en la prueba de MLP, donde los animales tratados fueron capaces de distinguir un estímulo familiar de uno novedoso a diferencia del grupo vehículo.

La pérdida de memoria en etapas tempranas de la EA se atribuye a una disfunción sináptica y no a la muerte neuronal, siendo el βA soluble el factor patogénico que ha demostrado alterar rápidamente la plasticidad sináptica en estudios in vivo e in vitro, inhibiendo la LTP (Lambert et al., 2001; Townsend et al., 2006; Walsh et al., 2002) y facilitando la LTD (Hsieh et al., 2006; Shankar et al., 2008; Wang et al., 2004). Gao y colaboradores (2006) sugirieron que la liberación alterada de dopamina podría producir un tráfico anormal de receptores AMPA y desregular mecanismos de plasticidad, lo cual apoya la relevancia de un

enfoque dopaminérgico para el tratamiento de la EA. Un experimento ha mostrado que el cambio de LTD a LTP depende de los niveles de dopamina antes de la estimulación sináptica (Kolomiets et al., 2009), y se ha probado que el agonista dopaminérgico RTG restaura mecanismos de plasticidad cortical tipo LTP en pacientes con la EA (Koch et al., 2014). La restauración de la expresión de LTP de la vía Bla-CI al administrar nomifensina en la CI del ratón 3xTg-AD demuestra que el incremento de niveles de dopamina tiene un alcance terapéutico con mucho potencial (Moreno-Castilla et al., 2016).

Este trabajo confirma el requerimiento de liberación de dopamina en la CI para la detección de un estímulo novedoso. La restauración de la liberación de dopamina por medio del tratamiento con levodopa, fue suficiente para que los ratones viejos 3xTg-AD pudieran tener un buen desempeño en la prueba de MLP en la prueba de ORM.

6.2 El tratamiento con levodopa en la memoria espacial

En la prueba de OLM encontramos que los animales tratados con levodopa mostraron un incremento significativo en TTE en la fase de MLP2 respecto a la fase de ADQ2. El incremento en la exploración del contexto novedoso que mostraron los ratones tratados con levodopa, puede reflejar que los animales identificaron la nueva conformación espacial considerando que un incremento de exploración presume la detección una novedad contextual en roedores (Manns et al., 2009). Adicionalmente, se ha encontrado que ratones viejos con la mutación APP_{swe} son capaces de formar memorias de objetos y del arreglo espacial de estos en un contexto, pero son incapaces de integrar esta información, condición que se atribuye a cambios en la conectividad entre la corteza entorrinal y el hipocampo (Good y Hale, 2007). Lo anterior podría explicar el que el ratón 3xTg-AD pueda reconocer un cambio en el espacio pero no integre cuál de los objetos fue el que cambió de ubicación, lo que se refleja como un incremento en el tiempo en el que exploran pero sin mejorar el reconocimiento del objeto en la nueva ubicación.

La principal explicación a por qué no se hallaron diferencias significativas en el desempeño cognitivo del MWM y en el IE2 del OLM, entre el grupo tratado con levodopa respecto al grupo vehículo, es la edad, un factor importante y ya conocido en la ejecución de pruebas conductuales. En la prueba de MWM, se ha demostrado que la edad produce un déficit progresivo en el desempeño de la tarea en ratas y ratones (Brandeis, et al., 1989; Gallagher et al., 1990). En ratones viejos (12 meses en adelante) se ha descrito que el LTP tardío en el hipocampo se encuentra alterado y correlaciona con un déficit en el desempeño de una prueba de memoria espacial. Aunado a esto, la progresión de la neuropatología tiene una fuerte correlación con el envejecimiento: conforme aumenta la edad, aumenta la presencia de marcadores neuropatológicos (Webster, et al., 2014). Ante esta situación, se esperaría

que algunos tratamientos podrían no ser suficientes para aminorar algunos de los síntomas cognitivos observados en la EA si la enfermedad se encuentra en una etapa tardía.

Actualmente se propone que el procesamiento de la memoria espacial en roedores depende principalmente de la actividad de los receptores NMDA (D'Hooge & Deyn, 2001). La dopamina participa como un modulador de la plasticidad sináptica hipocampal (Laeremans et al., 2015; R. G. Morris, et al., 1986). Se ha observado que la vulnerabilidad del hipocampo a la neuropatología es mayor a la de otras regiones, puesto que se ha encontrado que en el ratón 3xTg-AD, la función sináptica en el hipocampo se encuentra comprometida desde etapas tempranas, cuando aún sólo se puede detectar β A intraneuronal (Oddo et al., 2003). Esto se ha atribuido a que el hipocampo es más propenso a tener actividades excitatorias aberrantes glutamatérgicas y colinérgicas inducidas por la presencia de β A (Kamenetz et al., 2003; Palop et al., 2007). Estas alteraciones también existen a nivel dopaminérgico, donde en pacientes con la EA se ha encontrado que en el hipocampo el potencial de la unión a receptores D_2 baja a un 30% (Kemppainen et al., 2003) y se asocia con problemas cognitivos y anormalidades conductuales en pacientes (Tanaka et al., 2003). Dado lo anterior, no resulta sorprendente observar que los procesos cognitivos dependientes del hipocampo, como la memoria espacial, sean los primeros en ser afectados.

El efecto de la neuropatología en conjunto con el envejecimiento se ha observado claramente en el ratón 3xTg-AD y se refleja en su desempeño conductual. Se ha encontrado que los ratones de 9 meses de edad en adelante ya no se desempeñan igual que los controles silvestres y ya presentan un déficit en la ejecución de las tareas, incluyendo la prueba de ORM y MWM (Webster et al., 2014). De acuerdo a lo descrito por el grupo de Clinton (2007), el modelo 3xTg-AD presenta déficits en la tarea de MWM a los 4 meses, mucho antes que en la prueba de ORM, que los presenta hasta los 9 meses. En otro reporte, se encontró el déficit en la ejecución del MWM hasta los 6 meses (Giménez-Llort et al., 2007). En la prueba de OLM se observa una situación similar, en la cual ya se ha confirmado que a los 12 meses de edad este modelo murino tiene un déficit en la ejecución de la tarea (Davis et al., 2013), lo que iría de acuerdo a lo que se encontró en este trabajo. En el reporte publicado por el grupo de Billings (2005) describen que los animales 3xTg-AD de 6 meses tenían dificultad en retener la memoria requerida para realizar la tarea de MWM y presentaron un déficit en la expresión de la LTP. Al remover el β A intraneuronal en el hipocampo de ratones 3xTg-AD de 4 meses por medio de inmunoterapia, fue posible revertir los déficits en la retención de la memoria espacial de la tarea de MWM. El trabajo previo demostró que la acumulación intraneuronal de β A produce un déficit cognitivo en el modelo triple transgénico, pero el que la recuperación de la ejecución de la tarea a través de inmunoterapia sólo se haya demostrado ratones jóvenes, deja la incógnita de si hubiera sido igual de efectivo en ratones viejos. En edades posteriores se han detectado alteraciones

más graves, incluyendo atrofia en el hipocampo, que podrían contribuir a peores problemas cognitivos, ya que los ratones 3xTg-AD de 18 meses son incapaces de siquiera adquirir la tarea de MWM (Giménez-Llort et al., 2007).

Los resultados obtenidos en suma a los trabajos revisados, nos indican que el tratamiento sub-agudo con levodopa a una dosis de 50 mg/kg no es suficiente para mejorar el desempeño del ratón 3xTg-AD de 11 y 12 meses en la prueba conductual de OLM y MWM. Este fenómeno se atribuye a que la memoria espacial es una función cognitiva dependiente de hipocampo, una región que es particularmente vulnerable a alterarse con el envejecimiento y con la progresiva acumulación de la neuropatología.

6.3 El tratamiento con levodopa sobre la acumulación de β A en el ratón 3xTg-AD

Los resultados del análisis histológico de los cerebros de los ratones 3xTg-AD sugiere que el tratamiento con levodopa disminuye la acumulación intraneuronal de β A en las regiones de la CI y CA1 en el hipocampo. La acumulación de β A es un evento temprano en la progresión de la neuropatología y precede la aparición de placas seniles extracelulares (LaFerla et al., 2007).

La patología amiloide del ratón 3xTg-AD se distribuye en patrones y de forma diferencial en distintas regiones cerebrales, lo cual se atribuye a la interconectividad anatómica de proyecciones neuronales y el procesamiento de APP (Mastrangelo y Bowers, 2008). El anticuerpo utilizado para detectar el β A en este trabajo fue el 6E10, el cual reconoce el residuo 1-16 de este péptido. Este anticuerpo comienza a detectar la expresión de APP/ β A desde los 3 meses de edad en la región más caudal del hipocampo, en neuronas de la capa II y III de la corteza entorrinal, y neuronas de la corteza motora primaria (Mastrangelo y Bowers, 2008). Esto coincide con lo que se observó en este trabajo, donde se observó la presencia del β A en estas mismas regiones en los ratones de 12 meses, así como una marcada señal en la amígdala basolateral.

En este trabajo, la detección del β A por este anticuerpo ocurrió casi exclusivamente de forma intraneuronal, ya que el desarrollo de depósitos extracelulares en este modelo transgénico usualmente se hace aparente hasta la edad de 15 meses (Mastrangelo y Bowers, 2008). Aunque por la naturaleza del epítipo detectado, el anticuerpo utilizado no hace una distinción entre la acumulación de APP sobre el β A, se ha confirmado que existe una acumulación de oligómeros libres de β A intraneuronal en el ratón 3xTg-AD (Wirhth & Bayer, 2012). En modelos animales y celulares, se ha encontrado que el β A intraneuronal

se acumula en distintos compartimentos celulares, como es el sistema endosomal-lisosomal, el retículo endoplásmico y la red trans-Golgi (Iwata et al., 2001; Wirths et al., 2002).

Además de la presencia de β A intraneuronal en el ratón 3xTg-AD, algunos reportes la han hallado en pacientes con la EA y se ha propuesto que tiene un rol en desarrollo de la patología (Gyure et al., 2001; Hashimoto et al., 2010). La relevancia del β A intraneuronal yace en que la oligomerización del β A tanto en el ratón triple transgénico como en los pacientes podría comenzar de manera intraneuronal (Oddo, Caccamo, Tran, et al., 2006). Se ha descrito que el β A producido inicialmente por neuronas se deposita en terminales neuronales y puede formar agregados de mayor orden (Cummings et al., 1992), y fenómenos similares se han observado en líneas celulares neuronales y otros modelos transgénicos (Kawarabayashi, 2004; Takahashi, 2004; Walsh et al., 2000). Esto significa que la presencia del β A intraneuronal detectada en el ratón 3xTg-AD puede implicar consecuencias similares a las del β A extracelular, y perjudicar la homeostasis neuronal, función sináptica, y contribuir en el desarrollo del déficit cognitivo observado en este modelo.

Como ya se había mencionado anteriormente, Ono y colaboradores (2013) reportaron que tanto la levodopa como la dopamina impiden la agregación y formación de oligómeros tóxicos al ser incubadas *in vitro* con el β A40 y β A42. El trabajo mencionado propuso una interacción directa molecular, consistiendo en una unión covalente y específica de estos compuestos con el β A libre. La característica constituyente que tienen la levodopa y la dopamina es el grupo catecol, el cual también se encuentra en otros compuestos polifenólicos que han probado tener efectos anti-oligoméricos sobre el β A (Hamaguchi et al., 2009), incluyendo a la antes mencionada apomorfina (Figura 6.1). Este podría ser el caso del tratamiento con levodopa, ya que existe la posibilidad de que la dopamina tenga un efecto directo sobre la acumulación del β A *in vivo*.

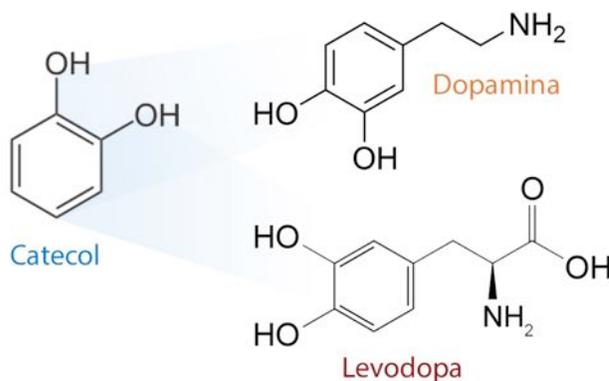


Figura 6.1 El grupo catecol constituye a las catecolaminas. El grupo catecol constituye a la dopamina y a la levodopa, entre otros compuestos.

Bajo esta hipótesis, la administración de levodopa podría estar mitigando los síntomas y la patología β A a través de distintos blancos de tratamiento. La levodopa es internalizada en las neuronas dopaminérgicas por el transportador de aminoácidos tipo-L, y tras su descarboxilación a dopamina, es transferida a vesículas sinápticas por el transportador vesicular de monoaminas. Dentro de la vesícula permanece almacenada hasta su liberación al espacio sináptico, momento en que la dopamina tiene la oportunidad de interactuar con el β A en el exterior de la célula y evitar su oligomerización. El equipo de Oddo (2006) ha propuesto que existe una relación dinámica entre el β A intraneuronal y extracelular, ya que la disminución de la acumulación de uno afecta la del otro y existe movimiento del β A dentro y fuera del compartimento celular. De esta manera, la disgregación del β A extracelular por la dopamina causaría una disminución en la β A intraneuronal al facilitar su limpieza. La activación de receptores dopaminérgicos también estaría produciendo un efecto terapéutico en las células nerviosas al reactivar los mecanismos necesarios para el procesamiento y mantenimiento de la memoria. El trabajo de Kalinin y colaboradores (2012) describió que en ratones transgénicos 5xFAD de 4.5 meses, la administración de L-DOPS, precursor de la noradrenalina y poseedor de un grupo catecol, incrementó los niveles de mRNA de enzimas degradadoras de β A como la neprilisina y la enzima degradadora de insulina. También se observó un incremento en marcadores de crecimiento neuronal como la sinaptofisina, BDNF, NGF y DBH, un marcador catecolaminérgico. Este efecto se atribuye a propiedades anti-inflamatorias del fármaco, y existe la posibilidad que la administración de levodopa esté produciendo cambios similares en el ratón 3xTg-AD, ayudando a restaurar la homeostasis celular perdida por causa de la acumulación tóxica del β A y promoviendo su limpieza en el interior de la neurona (Figura 6.2).

En nuestro trabajo encontramos una disminución significativa del β A intraneuronal en la CI. Desde el cuarto día del tratamiento con levodopa, se observó el incremento de los

niveles de dopamina y la mejora en la memoria de reconocimiento al quinto día, por lo que es poco probable que la recuperación cognitiva se deba a la disminución de la acumulación del β A por acción del tratamiento. Esto apoya la noción que la aminoración visible del β A intraneuronal al día 16 de la administración en la CI, sería resultado de la actividad dopaminérgica sumada a la interacción directa de la dopamina con el β A.

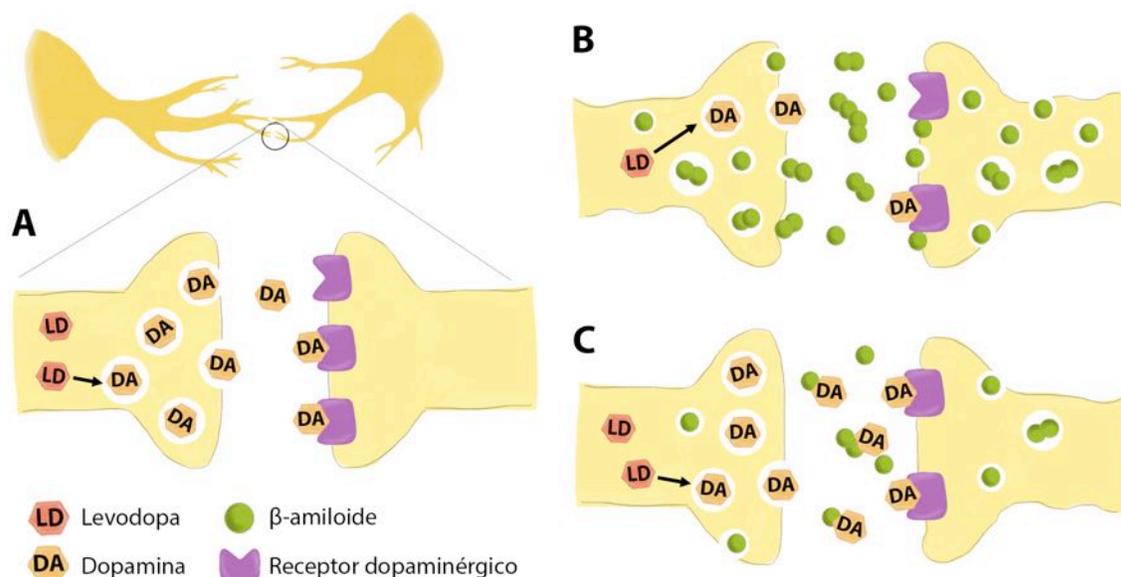


Figura 6.2 Hipótesis del mecanismo terapéutico de la levodopa. **A:** En condiciones normales, las terminales de las neuronas dopaminérgicas liberan dopamina al espacio extracelular, la cual activa receptores y genera una respuesta postsináptica. **B:** En la EA, formas oligoméricas de β A alteran el espacio sináptico y disminuyen la transmisión dopaminérgica, repercutiendo en la función de circuitos cognitivos y la homeostasis neuronal. **C:** La administración de levodopa restaura los niveles de DA, recuperando la función sináptica e impidiendo la agregación de oligómeros de β A en el espacio extracelular y fomenta la limpieza del β A intraneuronal.

En el caso de lo reportado para la memoria espacial, las dosis de levodopa previas a la prueba conductual no tuvieron un efecto significativo en el IE2 del OLM y en el desempeño en la memoria del MWM. Sin embargo, el análisis histológico indicó que la presencia del β A en el hipocampo dorsal disminuyó significativamente en CA1 en los animales tratados con levodopa. CA1 es la región del hipocampo que muestra una actividad importante durante aprendizaje de tareas de memoria espacial (Laeremans et al., 2015), lo cual sugiere que la presencia y actividad moduladora de la dopamina en esta región tuvo un efecto en disminuir la acumulación del β A, pero no el suficiente para recuperar la función cognitiva. Es muy probable que la limpieza del β A observado en CA1 sea resultado de los efectos de la dopamina en disgregar el β A más que por la actividad dopaminérgica.

El tratamiento con levodopa tuvo efectos muy contundentes en la región de la CI, recuperando la función cognitiva y disminuyendo la presencia de la neuropatología, a diferencia de su efecto en otras regiones como el hipocampo, donde se encontró un efecto

parcial, y en la amígdala y la corteza motora, en las que no se observaron diferencias. Aunque este trabajo propone que la levodopa tiene un efecto doble, donde por una parte produce estimulación dopaminérgica y por otra disminuye la neuropatología a través de la disgregación del β A, los resultados sugieren que el tratamiento con levodopa parece estar limitado a regiones donde la actividad dopaminérgica es predominante. Es probable que el fármaco esté teniendo efecto en múltiples regiones del cerebro, pero no con la misma eficacia ni significancia que la observada en un circuito dopaminérgico.

Los resultados obtenidos sugieren que el tratamiento sub-agudo con levodopa disminuye la acumulación del β A intraneuronal a través de una interacción directa de dopamina con el β A que impide la agregación de este péptido a formas oligoméricas, las que pueden acumularse dentro de las células del ratón 3xTg-AD. Esta disminución fue notoria en regiones donde se ha reportado actividad dopaminérgica.

6.4 Perspectivas

Dado que la levodopa se administró diariamente desde el inicio al fin del protocolo experimental, se desconoce si el efecto terapéutico de este fármaco se pudo haber mantenido sin necesidad de una administración sub-aguda, ya que la neurodegeneración catecolaminérgica en el ratón 3xTg-AD es severa y la síntesis endógena de levodopa es insuficiente para que haya una función cognitiva adecuada y participe en la disminución en la acumulación del β A. Es posible que un tratamiento con levodopa más prolongado pueda inducir la regeneración de terminales catecolaminérgicas, como se ha observado con otros fármacos (Nakamura, 1990). Otra posibilidad es aplicar el mismo protocolo experimental a ratones 3xTg-AD más jóvenes, para observar los efectos del tratamiento en una etapa donde la acumulación y toxicidad de β A tiene menor impacto.

Este protocolo experimental no permitió hacer una distinción de cuál de los posibles mecanismos de la levodopa podría estar teniendo un mayor efecto sobre la acumulación de la neuropatología, por lo que sería necesario experimentar con otros fármacos que tengan estas características disociadas y se facilite dilucidar el mecanismo terapéutico más efectivo. También resulta necesario analizar la molécula del β A con mayor profundidad para encontrar los mecanismos de interacción que tiene con moléculas o fármacos con potencial terapéutico.

Para un tratamiento más completo para la EA, la administración de levodopa podría ser en conjunto con otros fármacos, como es la memantina, que se dirija a tratar múltiples sistemas de neurotransmisión. Sin embargo, otra razón de por qué resulta necesario experimentar con otros fármacos similares a la levodopa es el posible riesgo que tiene el

tratamiento a largo plazo. En otras enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Parkinson, se han observado efectos secundarios en pacientes, habiendo reportes de picos anormales de dopamina, discinesia, pérdida de despotenciación sináptica, así como síntomas neuropsiquiátricos (Calabresi et al., 2015). Al entender a fondo los mecanismos terapéuticos de la levodopa sobre al EA, será posible desarrollar otras alternativas o tratamientos que tengan los mismos beneficios sin el temor de la aparición de efectos secundarios. Existen otros compuestos polifenólicos que también tienen la capacidad de modular al sistema catecolaminérgico (Fernández-Fernández et al., 2015), lo cual abre la posibilidad del desarrollo de nuevos fármacos que a través de la estimulación dopaminérgica o por sus propiedades anti-oligoméricas de βA , permitan la existencia de mejores tratamientos para la EA.

7 Conclusiones

Los resultados presentados en este trabajo cumplieron los objetivos planteados en un principio. Como se hipotetizó, la administración de levodopa incrementó la liberación de dopamina en el ratón 3xTg-AD de 12 meses, el cual tiene la característica de tener un déficit en este neurotransmisor. El tratamiento con levodopa demostró ser efectivo para aumentar la disponibilidad fisiológica de dopamina en el CNS del ratón 3xTg-AD. Como resultado, observamos cambios conductuales e histológicos en respuesta al tratamiento subagudo de una duración de 16 días.

El protocolo conductual de ORM fue exitoso para evaluar la ejecución de la memoria de reconocimiento del ratón 3xTg-AD de 12 meses, en el que encontramos que el incremento de la liberación de dopamina a través de la administración de levodopa restauró la memoria de reconocimiento del ratón 3xTg-AD. Este trabajo confirmó que la liberación de dopamina en la CI es un fenómeno necesario para el procesamiento de la familiaridad de un estímulo en el ratón 3xTg-AD.

Encontramos que en los ratones 3xTg-AD de 12 meses, el tratamiento con levodopa en el tiempo y dosis administrada no produjo una mejora significativa en el reconocimiento de la ubicación de objetos (OLM), pero mejora la identificación de un cambio contextual. Este tratamiento no modifica el desempeño en la ejecución del laberinto acuático de Morris (MWM). Este fenómeno se atribuye a que el envejecimiento y desarrollo de la neuropatología causan alteraciones importantes en el hipocampo que impiden el procesamiento adecuado de la memoria espacial.

Los datos obtenidos en el análisis histológico mostraron que el tratamiento con levodopa disminuyó la acumulación del β A intraneuronal en la CI. Aunque no se encontró una mejora cognitiva en tareas asociadas a la actividad del hipocampo, se encontró una disminución de β A intraneuronal en CA1 del hipocampo. Los efectos observados se atribuyen a una interacción directa de la dopamina con el β A y a la estimulación de la actividad dopaminérgica, que resulta en una disgregación del péptido acumulado en el espacio intraneuronal y extracelular. Este tratamiento es más efectivo en regiones donde se reporta actividad dopaminérgica.

El presente trabajo cumplió el objetivo de describir el efecto del tratamiento con levodopa sobre el desempeño cognitivo y la acumulación del β A en el modelo 3xTg-AD. Concluimos que el estudio de la actividad dopaminérgica en los procesos de aprendizaje y memoria, y su alteración en pacientes y en modelos para la enfermedad de Alzheimer, es una línea de investigación importante que no sólo amplía el conocimiento de esta enfermedad tan compleja, sino también permite el desarrollo de nuevos y mejores tratamientos que mejoren la calidad de vida de millones de personas que padecen esta enfermedad.

8 Referencias

- A. Armstrong, R. (2014). A critical analysis of the “amyloid cascade hypothesis”. *Folia Neuropathologica*, 3(3), 211–225. <http://doi.org/10.5114/fn.2014.45562>
- Ambrée, O., Richter, H., Sachser, N., Lewejohann, L., Dere, E., de Souza Silva, M. A., ... Schäbitz, W.-R. (2009). Levodopa ameliorates learning and memory deficits in a murine model of Alzheimer’s disease. *Neurobiology of Aging*, 30(8), 1192–1204. article. <http://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2007.11.010>
- Bäckman, L., Lindenberger, U., Li, S.-C. C., & Nyberg, L. (2010). Linking cognitive aging to alterations in dopamine neurotransmitter functioning: Recent data and future avenues. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 34(5), 670–677. <http://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2009.12.008>
- Balderas, I., Moreno-Castilla, P., & Bermudez-Rattoni, F. (2013). Dopamine D1 receptor activity modulates object recognition memory consolidation in the perirhinal cortex but not in the hippocampus. *Hippocampus*, 23(10), 873–8. <http://doi.org/10.1002/hipo.22143>
- Balderas, I., Rodríguez-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), 618–624. <http://doi.org/10.1101/lm.1028008>
- Baranello, R. J., Bharani, K. L., Padmaraju, V., Chopra, N., Lahiri, D. K., Greig, N. H., ... Sambamurti, K. (2015). Amyloid-Beta Protein Clearance and Degradation (ABCD) Pathways and their Role in Alzheimer’s Disease. *Current Alzheimer Research*, 12, 32–46.
- Bartus, R. T., Dean, R. L., Beer, B., & Lippa, A. S. (1982). The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science (New York, N.Y.)*, 217(4558), 408–14.
- Bennett, D. A., Yu, L. E. I., Yang, J., Srivastava, G. P., Aubin, C., & Jager, P. L. D. E. (2015). Epigenomics of Alzheimer’s disease. *Translational Research*, 165(1), 200–220. <http://doi.org/10.1016/j.trsl.2014.05.006>
- Berlyne, D. E. (1950). Novelty and Curiosity as Determinants of Exploratory Behaviour. *British Journal of Psychology. General Section*, 41(1–2), 68–80. <http://doi.org/10.1111/j.2044-8295.1950.tb00262.x>
- Bermudez-Rattoni, F., Okuda, S., Roozendaal, B., & McGaugh, J. L. (2005). Insular cortex is involved in consolidation of object recognition memory. *Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 12(5), 447–449. <http://doi.org/10.1101/lm.97605>
- Bermúdez-Rattoni, F., Ramírez-Lugo, L., Gutiérrez, R., & Miranda, M. I. (2004). Molecular signals into the insular cortex and amygdala during aversive gustatory memory formation. *Cellular and molecular neurobiology*, 24(1), 25–36.
- Billings, L. M., Oddo, S., Green, K. N., McGaugh, J. L., & LaFerla, F. M. (2005). Intraneuronal A β causes the onset of early Alzheimer’s disease-related cognitive deficits in transgenic mice. *Neuron*, 45(5), 675–88. <http://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.01.040>
- Bliss, T. V., & Lomo, T. (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *The Journal of physiology*, 232(2), 331–56.
- Boutajangout, A., Sigurdsson, E. M., & Krishnamurthy, P. K. (2011). Tau as a therapeutic target for Alzheimer’s disease. *Current Alzheimer research*, 8(6), 666–77.
- Braak, H., & Braak, E. (1991). Demonstration of amyloid deposits and neurofibrillary changes in whole brain sections. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)*, 1(3), 213–6.
- Braak, H., & Braak, E. (1995). Staging of Alzheimer’s disease-related neurofibrillary changes.

- Neurobiology of aging*, 16(3), 271-8-84.
- Brandeis, R., Brandys, Y., & Yehuda, S. (1989). The use of the Morris Water Maze in the study of memory and learning. *The International journal of neuroscience*, 48(1-2), 29-69.
- Bredberg, E., Lennernäs, H., & Paalzow, L. (1994). Pharmacokinetics of levodopa and carbidopa in rats following different routes of administration. *Pharmaceutical research*, 11(4), 549-55.
- Breitenstein, C., Korsukewitz, C., Flöel, A., Kretschmar, T., Diederich, K., & Knecht, S. (2006). Tonic Dopaminergic Stimulation Impairs Associative Learning in Healthy Subjects. *Neuropsychopharmacology*, 31(11), 2552-2564. <http://doi.org/10.1038/sj.npp.1301167>
- Bures, J., Bermudez-Rattoni, F., & Yamamoto, T. (1998). *Conditioned Taste Aversion*. Oxford University Press. <http://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780198523475.001.0001>
- Calabresi, P., Ghiglieri, V., Mazzocchetti, P., Corbelli, I., & Picconi, B. (2015). Levodopa-induced plasticity: a double-edged sword in Parkinson's disease? *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 370(1672), 20140184. <http://doi.org/10.1098/rstb.2014.0184>
- Carroll, J. C., Rosario, E. R., Chang, L., Stanczyk, F. Z., Oddo, S., LaFerla, F. M., & Pike, C. J. (2007). Progesterone and estrogen regulate Alzheimer-like neuropathology in female 3xTg-AD mice. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 27(48), 13357-13365. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2718-07.2007>
- Cartier, E. A., Parra, L. A., Baust, T. B., Quiroz, M., Salazar, G., Faundez, V., ... Torres, G. E. (2010). A biochemical and functional protein complex involving dopamine synthesis and transport into synaptic vesicles. *The Journal of biological chemistry*, 285(3), 1957-66. <http://doi.org/10.1074/jbc.M109.054510>
- Chan, S. L., Furukawa, K., & Mattson, M. P. (2002). Presenilins and APP in neuritic and synaptic plasticity: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neuromolecular medicine*, 2(2), 167-96. <http://doi.org/10.1385/NMM:2:2:167>
- Chouinard, J. (2000). Dysphagia in Alzheimer disease: a review. *The journal of nutrition, health & aging*, 4(4), 214-7.
- Cirrito, J. R., Disabato, B. M., Restivo, J. L., Verges, D. K., Goebel, W. D., Sathyan, A., ... Sheline, Y. I. (2011). Serotonin signaling is associated with lower amyloid- β levels and plaques in transgenic mice and humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(36), 14968-73. <http://doi.org/10.1073/pnas.1107411108>
- Clark, R. E., & Martin, S. J. (2005). Interrogating rodents regarding their object and spatial memory. *Current Opinion in Neurobiology*, 15(5), 593-598. <http://doi.org/10.1016/j.conb.2005.08.014>
- Cleary, J. P., Walsh, D. M., Hofmeister, J. J., Shankar, G. M., Kuskowski, M. A., Selkoe, D. J., & Ashe, K. H. (2005). Natural oligomers of the amyloid- β protein specifically disrupt cognitive function. *Nature neuroscience*, 8(1), 79-84. <http://doi.org/10.1038/nn1372>
- Clinton, L. K., Billings, L. M., Green, K. N., Caccamo, A., Ngo, J., Oddo, S., ... LaFerla, F. M. (2007). Age-dependent sexual dimorphism in cognition and stress response in the 3xTg-AD mice. *Neurobiology of Disease*, 28(1), 76-82. <http://doi.org/10.1016/j.nbd.2007.06.013>
- Contin, M., & Martinelli, P. (2010). Pharmacokinetics of levodopa. *Journal of Neurology*, 257(2), 253-261. article. <http://doi.org/10.1007/s00415-010-5728-8>
- Crouch, P. J., Harding, S.-M. E., White, A. R., Camakaris, J., Bush, A. I., & Masters, C. L. (2008). Mechanisms of A β mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 40(2), 181-98. <http://doi.org/10.1016/j.biocel.2007.07.013>
- Cullen, W. K., Suh, Y. H., Anwyl, R., & Rowan, M. J. (1997). Block of LTP in rat hippocampus in vivo by β -amyloid precursor protein fragments. *Neuroreport*, 8(15), 3213-7.
- Cummings, B. J., Su, J. H., Geddes, J. W., Van Nostrand, W. E., Wagner, S. L., Cunningham, D. D., & Cotman, C. W. (1992). Aggregation of the amyloid precursor protein within degenerating neurons and dystrophic neurites in Alzheimer's disease. *Neuroscience*, 48(4), 763-77.
- D'Hooge, R., & Deyn, P. P. De. (2001). *Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory*. *Brain Res Brain Res Rev* (Vol. 36). [http://doi.org/10.1016/S0165-0173\(01\)00067-4](http://doi.org/10.1016/S0165-0173(01)00067-4)
- Dalley, J. W., & Everitt, B. J. (2009). Dopamine receptors in the learning, memory and drug reward

- circuitry. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 20(4), 403–410. <http://doi.org/10.1016/j.semdb.2009.01.002>
- Davis, K. E., Easton, A., Eacott, M. J., & Gigg, J. (2013). Episodic-like memory for what-where-which occasion is selectively impaired in the 3xTgAD mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease: JAD*, 33(3), 681–98. <http://doi.org/10.3233/JAD-2012-121543>
- De La Cruz, V., Rodriguez-Ortiz, C. J., Balderas, I., & Bermudez-Rattoni, F. (2008). Medial temporal lobe structures participate differentially in consolidation of safe and aversive taste memories. *European Journal of Neuroscience*, 28(7), 1377–1381. <http://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06432.x>
- 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. <http://doi.org/10.1016/j.nlm.2010.12.007>
- Di Giovanni, S., Eleuteri, S., Paleologou, K. E., Yin, G., Zweckstetter, M., Carrupt, P.-A., & Lashuel, H. A. (2010). Entacapone and tolcapone, two catechol O-methyltransferase inhibitors, block fibril formation of alpha-synuclein and Amyloid- β and protect against amyloid-induced toxicity. *The Journal of biological chemistry*, 285(20), 14941–54. <http://doi.org/10.1074/jbc.M109.080390>
- Dickson, D. W., Crystal, H. A., Bevona, C., Honer, W., Vincent, I., & Davies, P. (1995). Correlations of synaptic and pathological markers with cognition of the elderly. *Neurobiology of aging*, 16(3), 285–98–304.
- 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), 579–94.
- Drachman, D. a. (2014). The amyloid hypothesis, time to move on: Amyloid is the downstream result, not cause, of Alzheimer's disease. *Alzheimer's & dementia: the journal of the Alzheimer's Association*, 10(3), 372–80. <http://doi.org/10.1016/j.jalz.2013.11.003>
- Ennaceur, A., J., D., & Delacour, J. (1988). A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behavioural Brain Research*, 31(1), 47–59.
- Fernández-Fernández, L., Esteban, G., Giralt, M., Valente, T., Bolea, I., Solé, M., ... Unzeta, M. (2015). Catecholaminergic and cholinergic systems of mouse brain are modulated by LMN diet, rich in theobromine, polyphenols and polyunsaturated fatty acids. *Food & function*, 6(4), 1251–60. <http://doi.org/10.1039/c5fo00052a>
- Filip, V., & Kolibás, E. (1999). Selegiline in the treatment of Alzheimer's disease: a long-term randomized placebo-controlled trial. Czech and Slovak Senile Dementia of Alzheimer Type Study Group. *Journal of psychiatry & neuroscience: JPN*, 24(3), 234–43.
- Fiorillo, C. D. (2004). The uncertain nature of dopamine. *Molecular Psychiatry*, 9(2), 122–123. <http://doi.org/10.1038/sj.mp.4001445>
- Foley, N. C., Affoo, R. H., & Martin, R. E. (2015). A Systematic Review and Meta-Analysis Examining Pneumonia-Associated Mortality in Dementia. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*, 39(1–2), 52–67. <http://doi.org/10.1159/000367783>
- Forsyth, J. K., Bachman, P., Mathalon, D. H., Roach, B. J., & Asarnow, R. F. (2015). Augmenting NMDA receptor signaling boosts experience-dependent neuroplasticity in the adult human brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(50), 15331–6. <http://doi.org/10.1073/pnas.1509262112>
- Freedman, M., Rewilak, D., Xerri, T., Cohen, S., Gordon, A. S., Shandling, M., & Logan, A. G. (1998). L-deprenyl in Alzheimer's disease: cognitive and behavioral effects. *Neurology*, 50(3), 660–8.
- Fuentes, P., & Catalan, J. (2011). A clinical perspective: anti tau's treatment in Alzheimer's disease. *Current Alzheimer research*, 8(6), 686–8.
- Fuxe, K., Marcellino, D., Leo, G., & Agnati, L. F. (2010). Molecular integration via allosteric interactions in receptor heteromers. A working hypothesis. *Current opinion in pharmacology*, 10(1), 14–22. <http://doi.org/10.1016/j.coph.2009.10.010>

- Gallagher, M., Burwell, R. D., Kodsi, M. H., McKinney, M., Southerland, S., Vella-Rountree, L., & Lewis, M. H. (1990). Markers for biogenic amines in the aged rat brain: relationship to decline in spatial learning ability. *Neurobiology of aging*, *11*(5), 507–14.
- Gao, C., Sun, X., & Wolf, M. E. (2006). Activation of D1 dopamine receptors increases surface expression of AMPA receptors and facilitates their synaptic incorporation in cultured hippocampal neurons. *Journal of neurochemistry*, *98*(5), 1664–77. <http://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.03999.x>
- Giménez-Llort, L., Blázquez, G., Cañete, T., Johansson, B., Oddo, S., Tobeña, A., ... Fernández-Teruel, A. (2007). Modeling behavioral and neuronal symptoms of Alzheimer's disease in mice: A role for intraneuronal amyloid. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *31*(1), 125–147. <http://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2006.07.007>
- Gong, Y., Chang, L., Viola, K. L., Lacor, P. N., Lambert, M. P., Finch, C. E., ... Klein, W. L. (2003). Alzheimer's disease-affected brain: presence of oligomeric A beta ligands (ADDLs) suggests a molecular basis for reversible memory loss. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(18), 10417–22. <http://doi.org/10.1073/pnas.1834302100>
- Good, M. a, & Hale, G. (2007). The “Swedish” mutation of the amyloid precursor protein (APP^{swe}) dissociates components of object-location memory in aged Tg2576 mice. *Behavioral neuroscience*, *121*(6), 1180–91. <http://doi.org/10.1037/0735-7044.121.6.1180>
- Götz, J., Schild, A., Hoerndli, F., & Pennanen, L. (2004). Amyloid-induced neurofibrillary tangle formation in Alzheimer's disease: insight from transgenic mouse and tissue-culture models. *International journal of developmental neuroscience: the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience*, *22*(7), 453–65. <http://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2004.07.013>
- Guo, Q., Fu, W., Sopher, B. L., Miller, M. W., Ware, C. B., Martin, G. M., & Mattson, M. P. (1999). Increased vulnerability of hippocampal neurons to excitotoxic necrosis in presenilin-1 mutant knock-in mice. *Nature medicine*, *5*(1), 101–6. <http://doi.org/10.1038/4789>
- 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), 453–460. article. <http://doi.org/10.1101/lm.026070.112>
- Guzmán-Ramos, K. R., Osorio-Gómez, D., Moreno-Castilla, P., Bermúdez-Rattoni, F., & Castilla, P. M. (2010). Off-line concomitant release of dopamine and glutamate involvement in taste memory consolidation. *Journal of neurochemistry*, *114*(1), 226–36. <http://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.06758.x>
- Gyure, K. A., Durham, R., Stewart, W. F., Smialek, J. E., & Troncoso, J. C. (2001). Intraneuronal A β -amyloid precedes development of amyloid plaques in Down syndrome. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, *125*(4), 489–492. [http://doi.org/10.1043/0003-9985\(2001\)125<0489:IAAPDO>2.0.CO;2](http://doi.org/10.1043/0003-9985(2001)125<0489:IAAPDO>2.0.CO;2)
- Haase, L., Wang, M., Green, E., & Murphy, C. (2013). Functional connectivity during recognition memory in individuals genetically at risk for Alzheimer's disease. *Human Brain Mapping*, *34*(3), 530–542. <http://doi.org/10.1002/hbm.21451>
- Haass, C., & Selkoe, D. J. (2007). Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid β -peptide. *Nature reviews. Molecular cell biology*, *8*(February), 101–112. <http://doi.org/10.1038/nrm2101>
- Hall, A. M., & Roberson, E. D. (2012). Mouse models of Alzheimer's disease. *Brain Research Bulletin*, *88*(1), 3–12. <http://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2011.11.017>
- Hamaguchi, T., Ono, K., Murase, A., & Yamada, M. (2009). Phenolic compounds prevent Alzheimer's pathology through different effects on the Amyloid- β aggregation pathway. *The American journal of pathology*, *175*(6), 2557–65. <http://doi.org/10.2353/ajpath.2009.090417>
- Hardy, J. A., & Higgins, G. A. (1992). Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science (New York, N.Y.)*, *256*(5054), 184–5.
- Hashimoto, M., Bogdanovic, N., Volkman, I., Aoki, M., Winblad, B., & Tjernberg, L. O. (2010). Analysis of microdissected human neurons by a sensitive ELISA reveals a correlation

- between elevated intracellular concentrations of A β 42 and Alzheimer's disease neuropathology. *Acta neuropathologica*, 119(5), 543–54. <http://doi.org/10.1007/s00401-010-0661-6>
- Himeno, E., Ohyagi, Y., Ma, L., Nakamura, N., Miyoshi, K., Sakae, N., ... Kira, J. (2011). Apomorphine treatment in Alzheimer mice promoting amyloid- β degradation. *Annals of neurology*, 69(2), 248–56. <http://doi.org/10.1002/ana.22319>
- Hsia, A. Y., Masliah, E., McConlogue, L., Yu, G.-Q., Tatsuno, G., Hu, K., ... Mucke, L. (1999). Plaque-independent disruption of neural circuits in Alzheimer's disease mouse models. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(6), 3228–33. <http://doi.org/10.1073/pnas.96.6.3228>
- Hsieh, H., Boehm, J., Sato, C., Iwatsubo, T., Tomita, T., Sisodia, S., & Malinow, R. (2006). AMPAR Removal Underlies A β -Induced Synaptic Depression and Dendritic Spine Loss. *Neuron*, 52, 831–843. <http://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.10.035>
- Iwata, H., Tomita, T., Maruyama, K., & Iwatsubo, T. (2001). Subcellular Compartment and Molecular Subdomain of β -Amyloid Precursor Protein Relevant to the A β 42-promoting Effects of Alzheimer Mutant Presenilin 2. *Journal of Biological Chemistry*, 276(24), 21678–21685. <http://doi.org/10.1074/jbc.M007989200>
- Jaqaman, K., Loerke, D., Mettlen, M., Kuwata, H., Grinstein, S., Schmid, S. L., & Danuser, G. (2008). Robust single-particle tracking in live-cell time-lapse sequences. *Nature methods*, 5(8), 695–702. <http://doi.org/10.1038/nmeth.1237>
- Jürgensen, S., Antonio, L. L., Mussi, G. E. a, Brito-Moreira, J., Bomfim, T. R., De Felice, F. G., ... Ferreira, S. T. (2011). Activation of D1/D5 dopamine receptors protects neurons from synapse dysfunction induced by amyloid- β oligomers. *Journal of Biological Chemistry*, 286(5), 3270–3276. <http://doi.org/10.1074/jbc.M110.177790>
- 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.
- Kalinin, S., Polak, P. E., Lin, S. X., Sakharkar, A. J., Pandey, S. C., & Feinstein, D. L. (2012). The noradrenaline precursor L-DOPS reduces pathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 33(8), 1651–1663. <http://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2011.04.012>
- Kamenetz, F., Tomita, T., Hsieh, H., Seabrook, G., Borchelt, D., Iwatsubo, T., ... Point, W. (2003). APP Processing and Synaptic Function. *Neuron*, 37, 925–937.
- Kandel, E., & Schwartz, J. (2013). *Principles of Neural Science, Fifth Edition*. McGraw Hill Professional.
- Kantarci, K. (2014). Molecular imaging of Alzheimer disease pathology. *AJNR. American journal of neuroradiology*, 35(6 Suppl), S12-7. <http://doi.org/10.3174/ajnr.A3847>
- Kawarabayashi, T. (2004). Dimeric Amyloid β Protein Rapidly Accumulates in Lipid Rafts followed by Apolipoprotein E and Phosphorylated Tau Accumulation in the Tg2576 Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Journal of Neuroscience*, 24(15), 3801–3809. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5543-03.2004>
- Kempainen, N., Laine, M., Laakso, M. P., Kaasinen, V., Någren, K., Vahlberg, T., ... Rinne, J. O. (2003). Hippocampal dopamine D2 receptors correlate with memory functions in Alzheimer's disease. *European Journal of Neuroscience*, 18(1), 149–154. <http://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2003.02716.x>
- Kim, D. H., Yeo, S. H., Park, J.-M., Choi, J. Y., Lee, T.-H., Park, S. Y., ... Cha, H.-J. (2014). Genetic markers for diagnosis and pathogenesis of Alzheimer's disease. *Gene*, 545(2), 185–93. <http://doi.org/10.1016/j.gene.2014.05.031>
- Klein, W. L., Lacor, P. N., Felice, F. G. De, & Ferreira, S. T. (2007). Molecules that disrupt memory circuits in Alzheimer's disease: the attack on synapses by A β oligomers (ADDLs). *Memories: Molecules and Circuits*, 155–179.
- Klyubin, I., Walsh, D. M., Lemere, C. A., Cullen, W. K., Shankar, G. M., Betts, V., ... Rowan, M. J. (2005). Amyloid β protein immunotherapy neutralizes A β oligomers that disrupt synaptic plasticity in vivo. *Nature medicine*, 11(5), 556–61. <http://doi.org/10.1038/nm1234>

- 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. <http://doi.org/10.1038/npp.2014.119>
- Koch, G., Esposito, Z., Codecà, C., Mori, F., Kusayanagi, H., Monteleone, F., ... Martorana, A. (2011). Altered dopamine modulation of LTD-like plasticity in Alzheimer's disease patients. *Clinical Neurophysiology*, 122(4), 703–707. <http://doi.org/10.1016/j.clinph.2010.10.033>
- Kolomiets, B., Marzo, A., Caboche, J., Vanhoutte, P., & Otani, S. (2009). Background dopamine concentration dependently facilitates long-term potentiation in rat prefrontal cortex through postsynaptic activation of extracellular signal-regulated kinases. *Cerebral Cortex*, 19(11), 2708–2718. <http://doi.org/10.1093/cercor/bhp047>
- Kumar, U., & Patel, S. C. (2007). Immunohistochemical localization of dopamine receptor subtypes (D1R-D5R) in Alzheimer's disease brain. *Brain Research*, 1131(1), 187–196. <http://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.10.049>
- Laeremans, A., Sabanov, V., Ahmed, T., Nys, J., Van de Plas, B., Vinken, K., ... Balschun, D. (2015). Distinct and simultaneously active plasticity mechanisms in mouse hippocampus during different phases of Morris water maze training. *Brain structure & function*, 220(3), 1273–90. <http://doi.org/10.1007/s00429-014-0722-z>
- LaFerla, F. M., & Green, K. N. (2012). Animal Models of Alzheimer Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(11), a006320–a006320. <http://doi.org/10.1101/cshperspect.a006320>
- LaFerla, F. M., Green, K. N., & Oddo, S. (2007). Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease. *Nature reviews. Neuroscience*, 8(7), 499–509. <http://doi.org/10.1038/nrn2168>
- Lambert, M. P., Barlow, A. K., Chromy, B. A., Edwards, C., Freed, R., Liosatos, M., ... Klein, W. L. (1998). Diffusible, nonfibrillar ligands derived from A β 1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(11), 6448–53. <http://doi.org/10.1073/pnas.95.11.6448>
- Lambert, M. P., Viola, K. L., Chromy, B. A., Chang, L., Morgan, T. E., Yu, J., ... Klein, W. L. (2001). Vaccination with soluble A β oligomers generates toxicity-neutralizing antibodies. *Journal of Neurochemistry*, 79(3), 595–605. <http://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2001.00592.x>
- Lisman, J. (2007). Long-term potentiation. *eLS*, 1–9. <http://doi.org/10.1002/9780470015902.a0000165.pub2>
- Lisman, J., Grace, A. A., & Duzel, E. (2011). A neoHebbian framework for episodic memory; role of dopamine-dependent late LTP. *Trends in neurosciences*, 34(10), 536–47. <http://doi.org/10.1016/j.tins.2011.07.006>
- Liu, Y., Yoo, M.-J., Savonenko, A., Stirling, W., Price, D. L., Borchelt, D. R., ... Lee, M. K. (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), 13805–14. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4218-08.2008>
- Maccioni, R. B., & Cambiazo, V. (1995). Role of microtubule-associated proteins in the control of microtubule assembly. *Physiological reviews*, 75(4), 835–864.
- Manns, J. R., & Eichenbaum, H. (2009). A cognitive map for object memory in the hippocampus. *Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 16(10), 616–624. <http://doi.org/10.1101/lm.1484509>
- Martinez-Coria, H., Green, K. N., Billings, L. M., Kitazawa, M., Albrecht, M., Rammes, G., ... LaFerla, F. M. (2010). Memantine improves cognition and reduces Alzheimer's-like neuropathology in transgenic mice. *The American journal of pathology*, 176(2), 870–80. <http://doi.org/10.2353/ajpath.2010.090452>
- Martorana, A., Esposito, Z., & Koch, G. (2010). Beyond the cholinergic hypothesis: Do current drugs work in alzheimer's disease? *CNS Neuroscience and Therapeutics*, 16(4), 235–245. <http://doi.org/10.1111/j.1755-5949.2010.00175.x>
- Martorana, A., & Koch, G. (2014). "Is dopamine involved in Alzheimer's disease?" *Frontiers in Aging Neuroscience*, 6, 252. <http://doi.org/10.3389/fnagi.2014.00252>

- 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. <http://doi.org/10.1186/1471-2202-9-81>
- Mayford, M., Siegelbaum, S. a., & Kandel, E. R. (2012). Synapses and memory storage. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(6), 1–18. <http://doi.org/10.1101/cshperspect.a005751>
- Moreno-Castilla, P., Rodriguez-Duran, L. F., Guzman-Ramos, K., Barcenas-Femat, A., Escobar, M. L., & Bermudez-Rattoni, F. (2016). Dopaminergic neurotransmission dysfunction induced by amyloid- β ; transforms cortical long-term potentiation into long-term depression and produces memory impairment. *Neurobiology of Aging*, 41, 187–199. *JOUR.* <http://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2016.02.021>
- Morris, R. (1984). Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, 11(1), 47–60. [http://doi.org/10.1016/0165-0270\(84\)90007-4](http://doi.org/10.1016/0165-0270(84)90007-4)
- Morris, R. G. M. G., Anderson, E., Lynch, G. S., & Baudry, M. (1986). Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature*, 319(6056), 774–776. <http://doi.org/10.1038/319774a0>
- Mucke, L., Masliah, E., Yu, G. Q., Mallory, M., Rockenstein, E. M., Tatsuno, G., ... McConlogue, L. (2000). High-level neuronal expression of A β 1-42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 20(11), 4050–4058. <http://doi.org/20/11/4050> [pii]
- Murai, T., Okuda, S., Tanaka, T., & Ohta, H. (2007). Characteristics of object location memory in mice: Behavioral and pharmacological studies. *Physiology and Behavior*, 90(1), 116–124. <http://doi.org/10.1016/j.physbeh.2006.09.013>
- Nagai, T., Takuma, K., Kamei, H., Ito, Y., Nakamichi, N., Ibi, D., ... Yamada, K. (2007). Dopamine D1 receptors regulate protein synthesis-dependent long-term recognition memory via extracellular signal-regulated kinase 1 / 2 in the prefrontal cortex, 117–125. <http://doi.org/10.1101/lm.461407> nificantly
- Nakamura, S. (1990). Antidepressants induce regeneration of catecholaminergic axon terminals in the rat cerebral cortex. *Neuroscience Letters*, 111(1–2), 64–68. [http://doi.org/10.1016/0304-3940\(90\)90345-A](http://doi.org/10.1016/0304-3940(90)90345-A)
- Nazarali, A. J., & Reynolds, G. P. (1992). Monoamine neurotransmitters and their metabolites in brain regions in Alzheimer's disease: a postmortem study. *Cellular and molecular neurobiology*, 12(6), 581–587. article.
- Nitsche, M. a, Kuo, M.-F., Grosch, J., Bergner, C., Monte-Silva, K., & Paulus, W. (2009). D1-receptor impact on neuroplasticity in humans. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 29(8), 2648–2653. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5366-08.2009>
- Nyakas, C., Granic, I., Halmy, L. G., Banerjee, P., & Luiten, P. G. M. (2011). The basal forebrain cholinergic system in aging and dementia. Rescuing cholinergic neurons from neurotoxic amyloid- β 42 with memantine. *Behavioural Brain Research*, 221(2), 594–603. <http://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.05.033>
- O'Shea, S. D., Smith, I. M., McCabe, O. M., Cronin, M. M., Walsh, D. M., & O'Connor, W. T. (2008). Intracerebroventricular administration of amyloid β -protein oligomers selectively increases dorsal hippocampal dialysate glutamate levels in the awake rat. *Sensors*, 8(11), 7428–7437. <http://doi.org/10.3390/s8117428>
- 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. <http://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2003.08.012>
- Oddo, S., Caccamo, A., Smith, I. F., Green, K. N., & LaFerla, F. M. (2006). A dynamic relationship between intracellular and extracellular pools of A β . *The American journal of pathology*, 168(1), 184–94.
- Oddo, S., Caccamo, A., Tran, L., Lambert, M. P., Glabe, C. G., Klein, W. L., & LaFerla, F. M. (2006). Temporal profile of amyloid- β (A β) oligomerization in an in vivo model of Alzheimer

- disease: A link between A β and tau pathology. *Journal of Biological Chemistry*, 281(3), 1599–1604. <http://doi.org/10.1074/jbc.M507892200>
- Ohara, P. T., Granato, A., Moallem, T. M., Wang, B.-R., Tillet, Y., & Jasmin, L. (2003). Dopaminergic input to GABAergic neurons in the rostral agranular insular cortex of the rat. *Journal of neurocytology*, 32(2), 131–41.
- Ono, K., Takasaki, J., Takahashi, R., Ikeda, T., & Yamada, M. (2013). Effects of antiparkinsonian agents on β -amyloid and α -synuclein oligomer formation in vitro. *Journal of Neuroscience Research*, 91(10), 1371–1381. article. <http://doi.org/10.1002/jnr.23256>
- Palop, J. J., Chin, J., Roberson, E. D., Wang, J., Thwin, M. T., Bien-Ly, N., ... Mucke, L. (2007). Aberrant Excitatory Neuronal Activity and Compensatory Remodeling of Inhibitory Hippocampal Circuits in Mouse Models of Alzheimer's Disease. *Neuron*, 55(5), 697–711. <http://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.07.025>
- Palop, J. J., & Mucke, L. (2010). Synaptic depression and aberrant excitatory network activity in Alzheimer's disease: two faces of the same coin? *Neuromolecular medicine*, 12(1), 48–55. <http://doi.org/10.1007/s12017-009-8097-7>
- Pignatelli, M., & Bonci, A. (2015). Role of Dopamine Neurons in Reward and Aversion: A Synaptic Plasticity Perspective. *Neuron*, 86(5), 1145–1157. <http://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.04.015>
- Pinessi, L., Rainero, I., De Gennaro, T., Gentile, S., Portaleone, P., & Bergamasco, B. (1987). Biogenic amines in cerebrospinal fluid and plasma of patients with dementia of Alzheimer type. *Functional neurology*, 2(1), 51–8.
- Preda, S., Govoni, S., Lanni, C., Racchi, M., Mura, E., Grilli, M., & Marchi, M. (2008). Acute β -amyloid administration disrupts the cholinergic control of dopamine release in the nucleus accumbens. *Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 33(5), 1062–1070. <http://doi.org/10.1038/sj.npp.1301485>
- Raina, P., Santaguida, P., Ismaila, A., Patterson, C., Cowan, D., Levine, M., ... Oremus, M. (2008). Annals of Internal Medicine Clinical Guidelines Effectiveness of Cholinesterase Inhibitors and Memantine for Treating Dementia: Evidence Review for a Clinical Practice Guideline. *Annals of Internal Medicine*, 148(5), 379–397. <http://doi.org/10.1488/5/379> [pii]
- Rajendran, L., Honsho, M., Zahn, T. R., Keller, P., Geiger, K. D., Verkade, P., & Simons, K. (2006). Alzheimer's disease beta-amyloid peptides are released in association with exosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(30), 11172–7. <http://doi.org/10.1073/pnas.0603838103>
- Reilly, M., Kim, J. (2013). Learning and memory. *eLS*. <http://doi.org/10.1002/9780470015902.a0000172.pub2>
- Rodrigues, S. M., Schafe, G. E., & LeDoux, J. E. (2004). Molecular mechanisms underlying emotional learning and memory in the lateral amygdala. *Neuron*, 44(1), 75–91. <http://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.09.014>
- Roy, S., Zhang, B., Lee, V. M.-Y., & Trojanowski, J. Q. (2005). Axonal transport defects: a common theme in neurodegenerative diseases. *Acta neuropathologica*, 109(1), 5–13. <http://doi.org/10.1007/s00401-004-0952-x>
- Sadegh Nabavi, Rocky Fox, Christophe D. Proulx, John Y. Lin, Roger Y. Tsien, & Roberto Malinow. (2014). Engineering a memory with LTD and LTP. *Nature*, 511(7509), 348–352. <http://doi.org/10.1038/nature13294>
- Savonenko, A., Xu, G. M., Melnikova, T., Morton, J. L., Gonzales, V., Wong, M. P. F., ... Borchelt, D. R. (2005). Episodic-like memory deficits in the APP^{swe}/PS1^{dE9} mouse model of Alzheimer's disease: Relationships to β -amyloid deposition and neurotransmitter abnormalities. *Neurobiology of Disease*, 18(3), 602–617. <http://doi.org/10.1016/j.nbd.2004.10.022>
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., ... Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature methods*, 9(7), 676–82. <http://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- Schneider, L. S. (2013). Alzheimer disease pharmacologic treatment and treatment research. *Continuum (Minneapolis, Minn.)*, 19(2 Dementia), 339–57. <http://doi.org/10.1212/01.CON.0000429180.60095.d0>

- Selkoe, D. (2002). Alzheimer's Disease Is a Synaptic Failure. *Science*, 298(October), 789–791.
- Selkoe, D. J. (2001a). Alzheimer's Disease: Genes, Proteins, and Therapy. *Physiological reviews*, 81(2), 741–766.
- Selkoe, D. J. (2001b). Presenilins , β -amyloid precursor protein and the molecular basis of Alzheimer's disease. *Clinical Neuroscience Research*, 1, 91–103. [http://doi.org/10.1016/S1566-2772\(00\)00016-5](http://doi.org/10.1016/S1566-2772(00)00016-5)
- Shankar, G. M., Li, S., Mehta, T. H., Garcia-Munoz, A., Shepardson, N. E., Smith, I., ... Selkoe, D. J. (2008). Amyloid- β protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nature medicine*, 14(8), 837–842. <http://doi.org/10.1038/nm1782>
- Shearman, E., Rossi, S., Szasz, B., Juranyi, Z., Fallon, S., Pomara, N., ... Lajtha, A. (2006). Changes in cerebral neurotransmitters and metabolites induced by acute donepezil and memantine administrations: a microdialysis study. *Brain research bulletin*, 69(2), 204–13. <http://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2005.12.001>
- Siegel, S. J., Bieschke, J., Powers, E. T., & Kelly, J. W. (2007). The oxidative stress metabolite 4-hydroxynonenal promotes Alzheimer protofibril formation. *Biochemistry*, 46(6), 1503–10. <http://doi.org/10.1021/bi061853s>
- Sisodia, S., & Tanzi, R. E. (2007). *Alzheimer's Disease: Advances in Genetics, Molecular and Cellular Biology*. (S. Sisodia & R. E. Tanzi, Eds.). Springer.
- Skovronsky, D. M., Doms, R. W., & Lee, V. M. (1998). Detection of a novel intraneuronal pool of insoluble amyloid beta protein that accumulates with time in culture. *The Journal of cell biology*, 141(4), 1031–9.
- Snowden, J. S., Thompson, J. C., Stopford, C. L., Richardson, A. M. T., Gerhard, A., Neary, D., & Mann, D. M. a. (2011). The clinical diagnosis of early-onset dementias: Diagnostic accuracy and clinicopathological relationships. *Brain*, 134(9), 2478–2492. <http://doi.org/10.1093/brain/awr189>
- Sperling, R. a., Dickerson, B. C., Pihlajamaki, M., Vannini, P., LaViolette, P. S., Vitolo, O. V., ... Johnson, K. a. (2010). Functional alterations in memory networks in early alzheimer's disease. *NeuroMolecular Medicine*, 12(1), 27–43. <http://doi.org/10.1007/s12017-009-8109-7>
- Spires, T. L. (2005). Dendritic Spine Abnormalities in Amyloid Precursor Protein Transgenic Mice Demonstrated by Gene Transfer and Intravital Multiphoton Microscopy. *Journal of Neuroscience*, 25(31), 7278–7287. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1879-05.2005>
- Squire, L., & Zola-Morgan, S. (1991). The medial temporal lobe memory system. *Science*, 253(5026), 1380–1386.
- Sterniczuk, R., Antle, M. C., Laferla, F. M., & Dyck, R. H. (2010). Characterization of the 3xTg-AD mouse model of Alzheimer's disease: part 2. Behavioral and cognitive changes. *Brain research*, 1348, 149–55. <http://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.06.011>
- 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.
- Sze, C. I., Troncoso, J. C., Kawas, C., Mouton, P., Price, D. L., & Martin, L. J. (1997). Loss of the presynaptic vesicle protein synaptophysin in hippocampus correlates with cognitive decline in Alzheimer disease. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 56(8), 933–44. <http://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>
- Takahashi, R. H. (2004). Oligomerization of Alzheimer's -Amyloid within Processes and Synapses of Cultured Neurons and Brain. *Journal of Neuroscience*, 24(14), 3592–3599. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5167-03.2004>
- Tanaka, Y., Meguro, K., Yamaguchi, S., Ishii, H., Watanuki, S., Funaki, Y., ... Itoh, M. (2003). Decreased striatal D2 receptor density associated with severe behavioral abnormality in Alzheimer's disease. *Annals of nuclear medicine*, 17(7), 567–73.
- Tang, L. C., & Cotzias, G. C. (1977). Quantitative correlation of dopamine-dependent adenylate cyclase with responses to levodopa in various mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(3), 1242–4.
- Thickbroom, G. W. (2007). Transcranial magnetic stimulation and synaptic plasticity: experimental framework and human models. *Experimental brain research*, 180(4), 583–93.

- <http://doi.org/10.1007/s00221-007-0991-3>
- Tom, S. E., Hubbard, R. A., Crane, P. K., Haneuse, S. J., Bowen, J., McCormick, W. C., ... Larson, E. B. (2015). Characterization of dementia and Alzheimer's disease in an older population: updated incidence and life expectancy with and without dementia. *American journal of public health*, *105*(2), 408–13. <http://doi.org/10.2105/AJPH.2014.301935>
- Townsend, M., Shankar, G. M., Mehta, T., Walsh, D. M., & Selkoe, D. J. (2006). Effects of secreted oligomers of amyloid β -protein on hippocampal synaptic plasticity: a potent role for trimers. *The Journal of Physiology*, *572*(2), 477–492. <http://doi.org/10.1113/jphysiol.2005.103754>
- Trabace, L., Kendrick, K. M., Castrignanò, S., Colaianna, M., De Giorgi, A., Schiavone, S., ... Govoni, S. (2007). Soluble amyloid beta1-42 reduces dopamine levels in rat prefrontal cortex: relationship to nitric oxide. *Neuroscience*, *147*(3), 652–63. <http://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.04.056>
- Trillo, L., Das, D., Hsieh, W., Medina, B., Moghadam, S., Lin, B., ... Salehi, A. (2013). Ascending monoaminergic systems alterations in Alzheimer's disease. Translating basic science into clinical care. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *37*(8), 1363–1379. <http://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2013.05.008>
- Tulving, E. Episodic memory: from mind to brain., *53Annual review of psychology* 1–25 (2002). <http://doi.org/10.1146/annurev.psych.53.100901.135114>
- Vianna, M. R., Izquierdo, L. a, Barros, D. M., Walz, R., Medina, J. H., & Izquierdo, I. (2000). Short- and long-term memory: differential involvement of neurotransmitter systems and signal transduction cascades. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, *72*(3), 353–64.
- Volkow, N. D., Fowler, J. S., Wang, G. J., Logan, J., Schlyer, D., MacGregor, R., ... Wolf, A. P. (1994). Decreased dopamine transporters with age in health human subjects. *Annals of neurology*, *36*(2), 237–9. <http://doi.org/10.1002/ana.410360218>
- Walsh, D. M., Klyubin, I., Fadeeva, J. V, Cullen, W. K., Anwyl, R., Wolfe, M. S., ... Selkoe, D. J. (2002). Naturally secreted oligomers of amyloid β protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature*, *416*(6880), 535–539. <http://doi.org/10.1038/416535a>
- Walsh, D. M., & Selkoe, D. J. (2007). A β Oligomers - A decade of discovery. *Journal of Neurochemistry*, *101*, 1172–1184. <http://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.04426.x>
- Walsh, D. M., Tseng, B. P., Rydel, R. E., Podlisny, M. B., & Selkoe, D. J. (2000). The oligomerization of amyloid beta-protein begins intracellularly in cells derived from human brain. *Biochemistry*, *39*(35), 10831–10839. <http://doi.org/bi001048s> [pii]
- Wang, H. Y., Lee, D. H., Davis, C. B., & Shank, R. P. (2000). Amyloid peptide A β (1-42) binds selectively and with picomolar affinity to alpha-7 nicotinic acetylcholine receptors. *Journal of neurochemistry*, *75*(3), 1155–1161. <http://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2000.0751155.x>
- Wang, Q., Walsh, D. M., Rowan, M. J., Selkoe, D. J., & Anwyl, R. (2004). Block of Long-Term Potentiation by Naturally Secreted and Synthetic Amyloid β -Peptide in Hippocampal Slices Is Mediated via Activation of the Kinases c-Jun N-Terminal Kinase, Cyclin-Dependent Kinase 5, and p38 Mitogen-Activated Protein Kinase as well as M. *Journal of Neuroscience*, *24*(13), 3370–3378. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1633-03.2004>
- Webster, S. J., Bachstetter, A. D., Nelson, P. T., Schmitt, F. a., & Van Eldik, L. J. (2014). Using mice to model Alzheimer's dementia: An overview of the clinical disease and the preclinical behavioral changes in 10 mouse models. *Frontiers in Genetics*, *5*(APR), 1–23. <http://doi.org/10.3389/fgene.2014.00088>
- Welzl, H., D'Adamo, P., & Lipp, H. (2001). Conditioned taste aversion as a learning and memory paradigm. *Behavioural brain research*, *125*, 205–213.
- Wenk, G. L. (2003). Neuropathologic changes in Alzheimer's disease. *Journal of Clinical Psychiatry*.
- Whitlock, J. R., Heynen, A. J., Shuler, M. G., & Bear, M. F. (2006). Learning induces long-term potentiation in the hippocampus. *Science (New York, N.Y.)*, *313*(5790), 1093–7. <http://doi.org/10.1126/science.1128134>
- Wirhth, O., & Bayer, T. A. (2012). Intraneuronal A β accumulation and neurodegeneration: lessons from transgenic models. *Life sciences*, *91*(23–24), 1148–52. <http://doi.org/10.1016/j.lfs.2012.02.001>
- Wirhth, O., Multhaup, G., Czech, C., Feldmann, N., Blanchard, V., Tremp, G., ... Bayer, T. A.

- (2002). Intraneuronal APP/A β trafficking and plaque formation in β -amyloid precursor protein and presenilin-1 transgenic mice. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)*, 12(3), 275–86.
- Wisniewski, M. L., Hwang, J., & Bahr, B. a. (2011). Submicromolar A β 42 reduces hippocampal glutamate receptors and presynaptic markers in an aggregation-dependent manner. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1812(12), 1664–1674. <http://doi.org/10.1016/j.bbadis.2011.09.011>
- Wurtman, R. (2015). Biomarkers in the diagnosis and management of Alzheimer's disease. *Metabolism*, 64(3), S47–S50. <http://doi.org/10.1016/j.metabol.2014.10.034>