



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

**Papel de la cinasa GSK3 y la proteína Tau en las alteraciones
de la actividad eléctrica espontánea del bulbo olfatorio
producidas por la proteína β -Amiloide.**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)

PRESENTA:

JOSÉ MARÍA CORNEJO MONTES DE OCA

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Fernando Peña Ortega
Instituto de Neurobiología UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. María Teresa Morales Guzmán
Instituto de Neurobiología UNAM

Dr. Francisco Gabriel Vázquez Cuevas
Instituto de Neurobiología UNAM

Dra. Wendy Portillo Martínez
Instituto de Neurobiología UNAM

Dr. Jaime Barral Caballero
FES Iztacala-UNAM

Juriquilla, Querétaro, septiembre 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.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

Los miembros del Comité Tutorial certificamos que la tesis elaborada por: José María Cornejo Montes de Oca, cuyo título es: **“Papel de la cinasa GSK3 y la proteína Tau en las alteraciones de la actividad eléctrica espontánea del bulbo olfatorio producidas por la proteína β -Amiloide”** se presenta como uno de los requisitos para obtener el grado de Maestría en Ciencias (Neurobiología) y cumple con los criterios de originalidad y calidad requeridos por la División de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Firma

Presidente

Dra. María Teresa Morales Guzmán

Secretario

Dr. José Fernando Peña Ortega

Vocal

Dr. Francisco Gabriel Vázquez Cuevas

Suplente

Dr. Jaime Barral Caballero

Suplente

Dra. Wendy Portillo Martínez

Aprobado por el Comité Académico

Coordinador del Programa

**EI PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO C-01
“CIRCUITOS NEURONALES”, EN EL DEPARTAMENTO DE NEUROBIOLOGÍA
DEL DESARROLLO Y NEUROFISIOLOGÍA, EN EL INSTITUTO DE
NEUROBIOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO,
BAJO LA SUPERVICIÓN DEL DR. JOSÉ FERNANDO PEÑA ORTEGA**

RESUMEN

La sobreproducción de la proteína *beta amiloide* ($A\beta$) está involucrada en la generación de los síntomas tempranos de la Enfermedad de Alzheimer (EA). Entre los síntomas más tempranos de la EA, se encuentra el deterioro en la capacidad olfativa. El deterioro olfativo en la EA se asocia con la presencia de oligómeros solubles de la $A\beta$ y de la proteína *tau* hiperfosforilada en el bulbo olfatorio (BO). Este estado de hiperfosforilación de la proteína tau es generado principalmente por la sobre-activación de la cinasa de la glicógeno sintasa tipo 3 (GSK3; por sus siglas en inglés). Debido a que el BO genera patrones oscilatorios espontáneos que le permiten modular la representación y el procesamiento de la información olfatoria; es interesante observar que la $A\beta$ inhibe la generación de estos patrones oscilatorios espontáneos en el BO. Por lo anterior, en este trabajo exploramos si el efecto deletéreo de la $A\beta$ sobre el BO involucra a la cinasa GSK3 y a la proteína *tau*. Para ello, se evaluó mediante registros de campo en rebanadas de cerebro, el efecto de la $A\beta$ [30 nM] sobre la actividad espontánea de la capa granular del BO principal en condiciones control, así como en presencia de inhibidores de la cinasa GSK3 y en rebanadas obtenidas de ratones en los que se redujo la expresión de la proteína tau. Los resultados muestran que el deterioro en la actividad espontánea del BO principal inducido por la aplicación de la $A\beta$ es prevenido por la inhibición de la enzima GSK3, pero no por la reducción de la expresión de la proteína tau. Estos resultados muestran que el deterioro de la funcionalidad del BO principal inducido por la $A\beta$ es independiente de la proteína *tau* e involucra a la GSK3, y sugieren que la GSK3 pudiera constituir un blanco terapéutico para paliar las alteraciones funcionales que se observan en las etapas tempranas de la EA.

(Palabras Clave: Beta Amiloide, Bulbo Olfatorio, Actividad Espontánea, GSK3, tau)

ABSTRACT

Overproduction of amyloid beta protein ($A\beta$) is involved in the generation of Alzheimer's disease (AD) olfactory deficit is among the earliest AD symptoms. AD-related olfactory impairment is associated with the presence of $A\beta$ soluble oligomers and hyperphosphorylated tau protein in the olfactory bulb (OB). Tau protein hyperphosphorylation is mainly generated by glycogen synthase kinase type 3 (GSK3) over-activation. Considering that the OB generates spontaneous oscillatory patterns that allow it to modulate the representation and processing of olfactory information, it is interesting that $A\beta$ inhibits the generation of such oscillatory patterns. Thus, in this study we explored whether the deleterious effect of $A\beta$ on the OB involves GSK3 and tau protein. Therefore, we evaluated, by means of field recordings in brain slices, the effect of $A\beta$ [30 nM] on the main OB granular layer spontaneous activity under control conditions, as well as in the presence of GSK3 inhibitors and in slices obtained from mice whose tau protein expression was reduced. The results show that the deterioration of the main the main OB spontaneous activity by application of $A\beta$ is prevented by GSK3 inhibition but not by reduction of tau protein expression. These results show that $A\beta$ -induced OB functional alteration is tau-independent and involves GSK3, suggesting that GSK3 could be a therapeutic target to palliate functional alterations associated to AD early stages.

(Keywords: amyloid beta, olfactory Bulb, Spontaneous Activity, GSK3, tau)

AGRADECIMIENTOS

A la Dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico otorgado
No. de Becario: 330985

El presente trabajo contó con el financiamiento del CONACyT con los proyectos No. 117, 235789, 237570, 246888, and 181323, de la DGAPA-UNAM con el proyecto No. IN200715 y la Cátedra Marcos Moshinsky.

Al Instituto de Neurobiología de la UNAM, por la oportunidad de formarme como Maestro en Ciencias (Neurobiología).

Al Dr. J. Fernando Peña Ortega por su guía y su constante búsqueda de formar científicos de excelencia, pero sobre todo por su paciencia para mostrarme su forma de hacer ciencia.

A la Psic. Ma. de Lourdes Lara Ayala responsable de la Unidad de Videoconferencia.

Al Dr. Francisco Javier Valles Valenzuela responsable de la Biblioteca campus Juriquilla.

A Edgar Bolaños Aquino, Técnico Académico, por su apoyo técnico para este trabajo.

A la M. en C. Leonor Casanova Rico, por todo el apoyo académico otorgado durante mi estancia en el INB y siempre estar al pendiente de mi, como estudiante del posgrado.

Al Ing. Ramón Martínez Olvera responsable de la Unidad de Computo.

Al Dr. Gerardo Rojas Piloni y al Dr. Jaime Barral Caballero por sus siempre atinadas aportaciones, ya que siempre propusieron cosas de una forma muy enriquecedora y positiva en la realización de mi trabajo de tesis y en mi formación como investigador.

Al Dr. Benito Ordáz por su apoyo técnico y formativo en el laboratorio.

A todos los miembros del laboratorio C-01 por toda la ayuda brindada durante la maestría.

A las secretarías Guadalupe Amador y Carmen Mendoza por todo el apoyo y tolerancia con respecto a la orientación y trámites realizados.

A todos los Doctores que formaron parte de mi preparación académica en el Instituto de Neurobiología, por sus enseñanzas y conocimientos compartidos.

A la Unidad de Proteogenómica

A la Dra. Anaid Antaramian por el apoyo otorgado con los experimentos realizados en la unidad de Proteogenómica

A la M. en C. Adriana González Gallardo por el análisis de datos, la realización de experimentos y el conocimiento compartido conmigo.

A la Unidad del Bioterio.

Al M.V.Z. José Martín García Servín responsable del Bioterio.

DEDICATORIAS

Este trabajo sin duda alguna está dedicado a mi familia, Lucia, Josué, Anahel, Sofía, José Carlos y Héctor que en todo momento me impulsan a seguir adelante y que no dejan de apoyarme sin importar las decisiones que tome, los amo.

Al Dr. Eugenio González Almada que sin el apoyo que en algún momento me brindó, no estaría realizando este logro en mi vida.

A Alvaro quien siempre esta presente para escucharme y aconsejarme sobre mi trabajo, aclarando dudas y compartiendo conocimiento para seguir creciendo juntos.

A Teresa Maldonado que sigue enriqueciendo mi vida y que gracias a ti, una vez más puedo terminar otra etapa de mi formación, sin ti no estaría aquí, viviendo adrede.

A las cuatro personas más importantes en esta etapa de mi vida, Mayra por apapachar mi alma, Maria por su honestidad y consuelo, Ilectra por mostrarme un camino que llenó mi vida de alegría y a Ruben Dario que me recordó la importancia de reir de mi mismo.

A Lidia que después de casi 17 años de amistad sigue presente en todo momento, Te amo.

A Eugenia González e Isaac Carmona a quienes siempre pienso y son un gran ejemplo y motivación para mi ser.

A Dina, Monse, Lau, Abdon, Arturo Isla, Monserrat, amigos especiales que llevo conmigo siempre.

Yo vivo de preguntar saber no puede ser lujo

“El escaramujo, Silvio Rodríguez”

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER (EA).....	3
2.1.1 Factores de riesgo de la EA.....	4
2.1.2 Etapas y síntomas de la EA.....	6
2.1.2.1 <i>Etapa temprana de la EA</i>	7
2.1.2.2 <i>Etapa moderada de la EA</i>	8
2.1.2.3 <i>Etapa avanzada de la EA</i>	9
2.1.3 ALTERACIONES DE LA FUNCIÓN OLFATORIA DURANTE LA EA.....	10
2.1.4 HISTOPATOLOGÍA DE LA EA.....	12
2.1.4.1 <i>Las marañas neurofibrilares</i>	12
2.1.4.2 <i>La proteína Beta Amiloide (Aβ)</i>	13
2.2 FUNCIÓN FISIOLÓGICA DE LA PROTEÍNA A β	15
2.2.1 Neuropatología inducida por la proteína A β soluble.....	16
2.2.2 Alteraciones funcionales producidas por la proteína A β en los circuitos neuronales.....	17
2.2.3 Señalización intracelular activada por la proteína A β	19
2.3 LA CINASA DE LA GLICÓGENO SINTASA TIPO 3 (GSK3).....	20
2.3.1 Estructura de la gsk3 y la regulación de su actividad	21
2.3.2 La cinasa GSK3 y la EA.....	22
2.4 LA PROTEÍNA TAU	23
2.4.1 La estructura y función de la proteína tau.....	24
2.4.2 Las Taupatías.....	25
2.5 EL BULBO OLFATORIO PRINCIPAL (BOP).....	29
2.5.1 Propiedades electrofisiológicas del BOP y sus alteraciones en condiciones patológicas.....	31
3. JUSTIFICACIÓN	33
4. HIPÓTESIS	35
5. OBJETIVO GENERAL	35
5.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
6. SUJETOS, MATERIALES Y MÉTODOS	35
6.1 OLIGOMERIZACIÓN DE LA A β	36
6.2 OBTENCIÓN DE REBANADAS DE BOP.....	36
6.3 REGISTRO ELECTROFISIOLÓGICO DE CAMPO DE LA CAPA GRANULAR DEL BOP <i>IN VITRO</i>	37
6.4 PRUEBAS CONDUCTUALES.....	38

6.5 DISMINUCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA TAU CON UN ARN INTERFERENTE.....	39
6.6 RT-qPCR.....	40
6.6.1 Purificación del ARN.....	40
6.6.2 Síntesis de ADN complementario (ADNc).....	41
6.6.3 PCR cuantitativa (qPCR).....	42
6.7 ANÁLISIS DE DATOS.....	43
6.7.1 Registros de campo.....	43
6.7.2 Análisis del nivel del ARN mensajero mediante el método $2^{\Delta\Delta CT}$	43
6.7.3 Análisis estadístico.....	44
7. RESULTADOS	45
7.1 LA CAPA GRANULAR DEL BOP GENERA ACTIVIDAD ESPONTÁNEA QUE SE MANTIENE ESTABLE A LO LARGO DEL TIEMPO (90 MIN).....	45
7.2 EFECTO DE LA APLICACIÓN DE LA PROTEÍNA A β SOBRE LA ACTIVIDAD ESPONTÁNEA DE LA CAPA GRANULAR DEL BOP.....	47
7.3 EFECTO DEL CLORURO DEL LITIO (LiCl, INHIBIDOR INESPECÍFICO DE LA GSK3) SOBRE EL DAÑO INDUCIDO POR LA PROTEÍNA A β EN LA ACTIVIDAD ESPONTÁNEA DE LA CAPA GRANULAR DEL BOP.....	49
7.4 EFECTO DE LA APLICACIÓN DEL SB216763, (INHIBIDOR SELECTIVO DE LA GSK3) SOBRE LA ACTIVIDAD ESPONTÁNEA DE LA CAPA GRANULAR DEL BOP EN PRESENCIA DE LA PROTEÍNA A β	51
7.5 EFECTO DEL TRATAMIENTO CON ÁCIDO TOLFENÁMICO SOBRE LA ACTIVIDAD ESPONTÁNEA DE LA CAPA GRANULAR DEL BOP EN PRESENCIA DE LA PROTEÍNA A β	53
7.6 EFECTO DE LA INYECCIÓN INTRABULBAR DEL shARN PARA EL TRANSCRITO DE LA PROTEÍNA TAU SOBRE LA ACTIVIDAD ESPONTÁNEA DE LA CAPA GRANULAR DEL BOP EN PRESENCIA DE LA PROTEÍNA A β	55
7.7 EFECTO DEL TRATAMIENTO CON LA PROTEÍNA A β , EL ÁCIDO TOLFENÁMICO Y EL shRNA DE TAU SOBRE LA OLFACCIÓN.....	57
8. DISCUSIÓN	62
8.1 ALTERACIONES PROVOCADAS POR LA APLICACIÓN DE LA PROTEÍNA A β SOBRE LA ACTIVIDAD ESPONTÁNEA DEL BOP.....	62
8.2 PARTICIPACIÓN DE LA ENZIMA GSK3 EN LAS ALTERACIONES PROVOCADAS POR LA APLICACIÓN DE LA PROTEÍNA A β SOBRE LA FUNCIONALIDAD DEL BOP	67

8.3 AUSENCIA DE PARTICIPACIÓN DE LA PROTEÍNA TAU EN LAS ALTERACIONES PROVOCADAS POR LA APLICACIÓN DE LA PROTEÍNA A β EN EL BOP.....	69
9. CONCLUSIONES.....	72
10. REFERENCIAS.....	73
11. LISTAS DE FIGURAS Y TABLAS.....	97
12. LISTA DE ABREVIATURAS.....	99

1. INTRODUCCION

La proteína β -Amiloide ($A\beta$) es una proteína relacionada con la fisiopatología de la Enfermedad de Alzheimer (EA) (Selkoe, 1993). La sobreproducción de la $A\beta$, que es producto tanto del procesamiento exacerbado de la proteína precursora del amiloide (APP), por la vía amiloidogénica, como de alteraciones en su degradación, parece estar involucrada en la generación de los síntomas de la EA (García-Osta y Alberini, 2009). Las formas solubles de la $A\beta$ están involucradas en la generación de los síntomas tempranos de la EA, mientras que las formas fibrilares participan en la generación de los síntomas tardíos de la enfermedad (Selkoe, 1993; Puzzo *et al.*, 2008; Wesson *et al.*, 2010a).

Entre los síntomas tempranos de la EA, se encuentra el deterioro en la capacidad olfativa (Thompson *et al.*, 1998; Mesholam *et al.*, 1998; Wesson *et al.* 2010b; Alvarado-Martínez *et al.*, 2013), mismo que pudiera utilizarse como método de diagnóstico temprano de la EA para, de esta manera, poder generar tratamientos preventivos que disminuyan la pérdida de las funciones cognitivas durante la misma (Warner, 1986). Estudios en pacientes con EA, así como en modelos animales de la misma, han podido determinar que la disminución olfativa que ocurre en las etapas tempranas de la patología (Wesson *et al.*, 2010a, 2011; Koike *et al.*, 2011), no está asociada con la presencia de la $A\beta$ en su estado insoluble (placas amiloideas) en el bulbo olfatorio principal (BOP), sino que pudiera deberse a alteraciones producidas por la $A\beta$ soluble sobre este circuito neuronal bulbar, así como por la presencia de la proteína tau en estado hiperfosforilado (Ohm y Braak 1997; Wesson *et al.*, 2010a; Koike *et al.*, 2011).

El deterioro olfativo ligado a las primeras etapas de la EA se asocia también a la hiperfosforilación de la proteína tau a través de la cinasa de la glicógeno sintasa cinasa tipo 3 (GSK3; por sus siglas en inglés) (Lovestone *et al.*, 1996; Sánchez *et al.*, 2000). La hiperfosforilación de la proteína tau genera una disminución en su afinidad para ensamblarse con los microtúbulos, lo que provoca la desestabilización de los mismos (Lovestone *et al.*, 1996; Sánchez *et al.*, 2000).

De forma interesante, con la progresión de la EA, aumenta la presencia de la proteína tau en comparación con la cantidad de beta-amiloide en el BOP (Attems *et al.*, 2005). Coincidentemente, en un estudio de tejido cerebral procedente de pacientes con EA, se determinó que la cantidad de la proteína tau en el BO es muy alta en las fases tempranas de la EA (Reyes *et al.*, 1993; Mundinano *et al.*, 2011; Mann *et al.*, 1988; Kovacs *et al.*, 2001). Además, se ha demostrado experimentalmente que la proteína tau es necesaria para el deterioro cognoscitivo inducido por la beta-amiloide (Hsiao *et al.*, 1996; Roberson *et al.*, 2007) y para el deterioro de la capacidad olfatoria (Liu *et al.*, 2003).

El BOP es una estructura telencefálica bilateral encargada de procesar la información olfativa y es el primer relevo en el procesamiento de la información olfatoria hacia las cortezas olfativas (Shepherd, 1972). El circuito del BOP está organizado en 7 capas, incluidas la capa glomerular y la granular que se caracterizan por ser los sitios donde converge la información olfativa entrante y saliente, respectivamente (Shepherd, 1972; Nieuwenhuys *et al.*, 2008). La capa granular del BOP juega un papel esencial en el procesamiento bulbar de la información olfatoria, pues regula la integración de la información entrante y modula la información saliente del BOP (Shepherd, 1972; Friedman y Strowbridge; 2003; Nieuwenhuys *et al.*, 2008). La participación de las otras capas del BOP en el procesamiento bulbar de la información olfatoria se describe más adelante en la sección titulada estructura del bulbo olfatorio.

Las propiedades eléctricas de los elementos del circuito del BOP, así como las conexiones sinápticas que se establecen entre ellos, le permiten generar patrones oscilatorios espontáneos en diferentes frecuencias de oscilación (Shepherd, 1972; Bressler, 1987; Kauer, 1988). El BOP es capaz de generar oscilaciones con frecuencias tipo theta (4-12 Hz), tipo beta (15-35 Hz) y tipo gamma (45-90 Hz) (Bressler, 1987; Kay *et al.*, 2005; Wesson *et al.*, 2010a). Estos patrones oscilatorios son considerados la base operacional del BOP, que le permiten la representación y el procesamiento de la información olfatoria (Wachowiak y Shipley, 2006; Kay *et al.*, 2005). Por ello, la alteración de los patrones oscilatorios en el BOP se asocia con la disminución de la capacidad

olfatoria (Le Pichon *et al.*, 2009; Martín *et al.*, 2012).

Dado que los oligómeros solubles de la A β son capaces de alterar los patrones oscilatorios espontáneos en el hipocampo, la corteza cerebral y el BOP (Alvarado-Martínez *et al.*, 2013; Villete *et al.*, 2010; Balleza-Tapia *et al.*, 2010, Adaya-Villanueva *et al.*, 2010; Peña-Ortega *et al.*, 2012), en este trabajo nos planteamos como hipótesis que la A β soluble es capaz de alterar la generación de actividad espontánea en la capa granular del BOP a través de la hiperfosforilación de la proteína tau mediada por la enzima GSK3.

2. ANTECEDENTES

2.1 La Enfermedad de Alzheimer (EA)

En 1907, el Dr. Aloysius Alzheimer hizo la descripción de una enfermedad nueva con base en observaciones de la paciente Auguste D, de 51 años de edad, quien presentaba síntomas que incluían: pérdida de la memoria, dificultades en la comprensión de la información, desorientación y alucinaciones (Alzheimer *et al.*, 1995). El análisis histológico *post mortem* del cerebro de la paciente reveló la presencia de agregados intracelulares y extracelulares que, eventualmente, se convirtieron en los marcadores histopatológicos de esta enfermedad (Alzheimer *et al.* 1995; Goedert y Spillantini 2006). Las observaciones realizadas por el Dr. Alzheimer describieron a la enfermedad en cuestión, como un tipo de demencia senil que más tarde Emil Kraepelin nombró como la Enfermedad de Alzheimer (EA) (Goedert y Spillantini, 2006).

Actualmente, la EA se define como una patología neurodegenerativa, crónica e irreversible (Maréchal *et al.*, 2006), caracterizada por deterioro en la capacidad olfativa (Thompson *et al.*, 1998; Mesholam *et al.*, 1998; Wesson *et al.*, 2010b), pérdida de la memoria, dificultades en la comprensión de la información, desorientación, alucinaciones, así como por la presencia de placas amiloideas y de marañas neurofibrilares (Alzheimer *et al.*, 1995). La EA es considerada la primera causa de demencia en pacientes mayores de 60 años (Barber, 2010). El envejecimiento se considera el factor de riesgo principal de la enfermedad (Wang, 2003), ya que la prevalencia de la EA se incrementa con el aumento en la edad

(Wang, 2003). A nivel mundial, la EA afecta alrededor de 370 millones de personas (Lopes y Bottino, 2002; Maiese *et al.*, 2009). Datos epidemiológicos obtenidos en los EUA muestran que el 3% de las personas de 65 a 74 años padecen EA, mientras que en personas de 80 años o más, este valor se dispara hasta un 47% (Hebert *et al.*, 2003).

El Consejo Nacional de Población de México determinó que actualmente existen 12.9 millones de mexicanos que son mayores de 60 años (10.8% de la población mexicana) y estima que para el año 2050 esta población se incrementará en un 22% (Zúñiga y Vega, 2005), para representar el 28% de la población total (36 millones de personas) (Zúñiga y Vega, 2005). De acuerdo con el Fondo de Población de las Naciones Unidas (UNFPA, por sus siglas en inglés), en 2014, 12% de la población mundial tenía una edad de 60 años o más, mientras que en las regiones más desarrolladas esta proporción llega a ser de 23.3% (INEGI-México, 2014). Estimaciones de la misma fuente, señalan que en el 2050, uno de cada cinco habitantes del planeta (21.2%) tendrá 60 años (INEGI-México, 2014). De hecho, el número de adultos mayores se duplicó en las últimas décadas (INEGI-México, 2014), pasando de 5 millones en 1990 a 11.7 millones en el 2014 (INEGI-México, 2014). De acuerdo a lo mencionado anteriormente, este aumento en la proporción de la población de adultos mayores también aumentará la cantidad de sujetos que padecen o padecerán la EA (Maiese *et al.*, 2009).

2.1.1 Factores de riesgo de la EA

La EA puede clasificarse en dos grupos: la EA familiar, que se produce por causas de origen genético y la EA esporádica, que representa todos los casos sin un origen genético aparente (Slachevsky *et al.*, 2007; Tanzi *et al.*, 1996). A pesar de que las causas exactas de estos dos tipos de EA pueden diferir, ambos tipos de EA comparten los mismos síntomas clínicos antes descritos (Lehtovirta *et al.*, 1996; Tanzi *et al.*, 1996). Sin embargo, la aparición de los síntomas en la EA familiar es más temprana y su progresión es más rápida (Slachevsky *et al.*, 2007; Tanzi *et al.*, 1996). La EA familiar es muy infrecuente, ya que representa menos

del 10% de todos los casos registrados (Wang, 2003). La EA familiar está asociada con mutaciones en genes autosómicos dominantes que codifican para la proteína precursora del amiloide (APP, por sus siglas en inglés), que se localiza en el cromosoma 21; la presenilina 1 (PS1), que se localiza en el cromosoma 1; y la presenilina 2 (PS2), que se localiza en el cromosoma 14 (Chartier-Harlin *et al.*, 1991; Goate *et al.*, 1991; Selkoe, 1997; Holmes, 2002). Es importante mencionar que todas las mutaciones asociadas a estos genes incrementan la producción de la proteína β amiloide 1-42 ($A\beta_{1-42}$); que es la forma de la $A\beta$ que más aumenta en los cerebros de los pacientes con EA (Selkoe 1999; Naslund *et al.*, 2000; Walsh y Selkoe 2001) y que es la responsable de los síntomas tempranos de la EA (Selkoe 1999; Naslund *et al.*, 2000; Walsh y Selkoe, 2007).

El 90% de los casos de EA son considerados de tipo esporádico, ya que no existe un factor etiológico identificado que explique su origen (Tanzi *et al.*, 1996). Comúnmente, estos pacientes presentan los primeros síntomas de la EA después de los 65 años (Tanzi *et al.*, 1996). A pesar de la ausencia de un origen genético directo, se ha reportado que existen factores genéticos predisponentes para la EA esporádica (Lehtovirta *et al.*, 1996; Raber *et al.*, 2004). Entre estos, el más importante, además del envejecimiento, es la expresión de un polimorfismo de la Apolipoproteína E (ApoE) (Raber *et al.*, 2004).

Existen tres isoformas de la ApoE: la E2, la E3 y la E4, de las cuales la E4 está relacionada con un incremento en la prevalencia de la EA (Raber *et al.*, 2004), mientras que las isoformas E2 y E3 están asociadas a una menor prevalencia de la enfermedad (Farrer *et al.*, 1997; Corder *et al.*, 1998). La expresión de la ApoE4 puede aumentar 3 veces el riesgo de desarrollar la EA en heterocigotos y 15 veces en homocigotos (Tanzi *et al.*, 1996; Blennow *et al.*, 2006). Así pues, se estima que la expresión de la ApoE4 se asocia al 20% de los casos de la EA esporádica (Chapman *et al.*, 2001).

Existen otros factores de riesgo no genéticos para desarrollar la EA como son: la presencia de enfermedades cardiovasculares (Luchsinger *et al.*, 2004), la hipertensión (Luchsinger *et al.*, 2004); los niveles de colesterol altos (Luchsinger *et al.*, 2004), la obesidad (de Toledo Ferraz Alves *et al.*, 2010), el infarto del miocardio

(de Toledo Ferraz Alves *et al.*, 2010; Holscher 2011) y la diabetes (de Toledo Ferraz Alves *et al.*, 2010; Holscher 2011), que pueden aumentar las probabilidades de padecer EA hasta en un 34%. Sin embargo, el factor más importante para desarrollar la EA es la senescencia, ya que la EA esporádica afecta mayormente a individuos mayores de 65 años de edad (Brookmeyer *et al.*, 1998; Wimo *et al.*, 2003). Además, la probabilidad de desarrollar la EA se incrementa al doble cada 5 años a partir de los 65 años, hasta alcanzar una prevalencia del 50% de la población a los 85 años (Brookmeyer *et al.*, 1998; Wimo *et al.*, 2003).

2.1.2 Etapas y síntomas de la EA

Como ya mencionamos anteriormente, durante el desarrollo de la EA se pueden presentar alteraciones progresivas en algunas de las funciones cognitivas (Backman *et al.*, 2005; Small *et al.*, 2007; Salmon, 2012). Los primeros síntomas que presentan los pacientes con EA son usualmente confundidos con el envejecimiento normal o incluso con el estrés (Doraiswamy *et al.*, 1998; Spaan *et al.*, 2003). Sin embargo, el envejecimiento promueve alteraciones en los procesos de memoria y aprendizaje de manera normal que, a diferencia de la EA, no interfieren con la capacidad del individuo de realizar las actividades de la vida diaria (Morrison y Hof, 1997). A pesar de lo anterior, se ha propuesto que el síntoma temprano más sobresaliente de la EA es una pérdida ligera de la memoria de corto plazo; que se refleja como la dificultad para recordar eventos recientes (Forstl y Kurz, 1999; Backman *et al.*, 2004; Salmon, 2012). Además, se observan alteraciones en el aprendizaje que se traducen en la incapacidad de adquirir información nueva (Arnaiz y Almkvist, 2003; Backman *et al.*, 2004). Otro síntoma característico de la etapa temprana de la EA es un deterioro ligero en otros procesos cognoscitivos como la atención, la planificación y el pensamiento abstracto (Backman *et al.*, 2004). De esta forma, el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer se puede agrupar clínicamente en tres etapas (temprana, intermedia y avanzada) (Martínez-Gil, 2009; Forstl y Kurz, 1999), mismas que se describen a continuación.

2.1.2.1 Etapa Temprana de la EA

La primera etapa de la EA, o etapa “amnésica”, se caracteriza por un deterioro moderado de la memoria que se acompaña de desorientación espacial, además de alteraciones en el estado de ánimo, de agitación, de depresión y de hiperactividad (Forstl y Kurz, 1999). Durante esta etapa, ocurren episodios de olvido ligero que eventualmente se manifiestan de forma más pronunciada, sobretodo, en la memoria de corto plazo (Carlesimo y Oscar-Berman, 1992; Jellicic *et al.*, 1995). El deterioro de la memoria episódica (memoria relacionada con sucesos autobiográficos) tiene una progresión retrógrada, de manera que los eventos más próximos a la niñez son más fáciles de recordar para el paciente, en contraste a los eventos recientes (Carlesimo y Oscar-Berman, 1992). Las alteraciones en la memoria semántica, como la memoria de significados y relaciones conceptuales, también pueden ser un síntoma temprano de la EA (Backman *et al.*, 2004; Salmon, 2012).

Durante la etapa amnésica también aparecen problemas en la percepción (agnosia), en la ejecución de movimientos (apraxia) y hay alteraciones en el estado de ánimo (Forstl y Kurz, 1999). También se observan alteraciones en la planeación, la memoria de trabajo, la atención y el razonamiento verbal, entre otras (Chan *et al.*, 2008). La memoria semántica (conocimiento conceptual y fáctico) y la memoria implícita (la relacionada con hábitos o destrezas), también presentan alteraciones muy ligeras en esta etapa de la EA (Carlesimo y Oscar-Berman, 1992; Jellicic *et al.*, 1995). Asimismo, en esta etapa de la EA, también se observan problemas de lenguaje como la disminución del vocabulario y la fluidez verbal, que se manifiestan como un empobrecimiento del lenguaje oral y escrito (Forstl y Kurz 1999; Taler y Phillips, 2008). No obstante, los pacientes en esta etapa aún son capaces de comunicar ideas básicas, de forma adecuada (Frank, 1994; Forstl y Kurz, 1999; Taler y Phillips, 2008).

Los pacientes en la etapa amnésica de la EA son capaces de realizar tareas motoras finas como dibujar, escribir o vestirse (Forstl y Kurz, 1999). Entre los síntomas más tempranos de la EA, se encuentra un deterioro en la capacidad

olfativa (Thompson *et al.*, 1998; Mesholam *et al.*, 1998; Wesson *et al.*, 2010b; Alvarado-Martínez *et al.*, 2013). De hecho, se ha propuesto que este deterioro pudiera utilizarse como método diagnóstico temprano de la EA (Warner, 1986). Asimismo, el deterioro olfativo ligado a las primeras etapas de la EA se asocia también con alteraciones en la corteza piriforme la cual es la principal corteza de este sistema sensorial (Liu *et al.*, 2003).

2.1.2.2 Etapa Moderada de la EA

En la segunda etapa, o “fase de confusión o moderada”, se presenta un deterioro súbito y progresivo de algunas funciones cognoscitivas que derivan en trastornos como la apraxia, la afasia, la agnosia y discalculia (Forstl y Kurz, 1999). Durante la etapa moderada de la EA, los pacientes son menos independientes y se vuelven incapaces de realizar la mayoría de las actividades de la vida diaria (Forstl y Kurz, 1999). Las alteraciones en el lenguaje se vuelven más evidentes, ya que el paciente no puede recordar partes del vocabulario, lo que le obliga a sustituir las palabras de forma incorrecta (parafasias) (Manenti *et al.*, 2004). También, durante esta etapa, la capacidad de lectura y escritura se pierden de manera progresiva, así como la coordinación para desarrollar tareas motoras complejas (Frank, 1994; Forstl y Kurz, 1999). Los problemas de memoria se acentúan y los pacientes tienen dificultad para reconocer a parientes cercanos (Forstl y Kurz, 1999) y la memoria de largo plazo también comienza a deteriorarse (Forstl y Kurz, 1999). En esta etapa de la EA se pueden presentar delirios, en los que el paciente cree que las personas u objetos han sido alterados o cambiados por completo (Reisberg *et al.*, 1996). Es común que durante esta etapa de la EA, los pacientes presenten alucinaciones; principalmente visuales (Perry *et al.*, 1990). Por otro lado, las alteraciones conductuales se vuelven más evidentes y se manifiestan como desorientación, vagancia, irritabilidad, agresividad física o verbal (Stern *et al.*, 1997).

2.1.2.3 Etapa Avanzada de la EA

En la etapa avanzada o “demencial” de la EA, se presenta un deterioro cognoscitivo severo que se complica con un deterioro en la función motora, el cual se asocia a incontinencia urinaria y fecal, así como a alteraciones en la postura y en la marcha (Forstl y Kurz, 1999).

En la etapa demencial de la EA, la memoria está completamente comprometida y los pacientes pierden la capacidad de evocar los recuerdos biográficos más antiguos (Forstl y Kurz, 1999). El lenguaje se reduce drásticamente a palabras o frases simples, lo que eventualmente deriva en la pérdida completa de la capacidad de comunicación oral (Frank, 1994; Forstl y Kurz, 1999). El deterioro de las capacidades cognitivas que se observa en esta etapa de la EA va acompañado también de cambios conductuales (Burns *et al.*, 1990; Pérez-Madrinan *et al.*, 2004). Los pacientes se vuelven agresivos, depresivos o apáticos; incluso algunos pacientes presentan cuadros paranoicos y alucinaciones (Burns *et al.*, 1990; Pérez-Madrinan *et al.*, 2004; Apostolova *et al.*, 2007).

Una característica importante de esta etapa es la apraxia, que se manifiesta como la incapacidad de realizar cualquier actividad de la vida diaria; incluso masticar y tragar los alimentos (Forstl y Kurz, 1999). Durante esta etapa final de la EA, la masa muscular y la movilidad se deterioran al punto de que los pacientes están confinados a una silla de ruedas o a la cama (Forstl y Kurz, 1999).

Como se mencionó, la EA es considerada como una patología terminal (Burns *et al.*, 1991; Bracco *et al.*, 1994; Bowen *et al.*, 1996), debido a que después del diagnóstico clínico, la expectativa de vida del paciente se reduce a aproximadamente 5 años (Heyman *et al.*, 1987). No obstante, la causa de la muerte suele no ser relacionada directamente a la enfermedad (Forstl y Kurz, 1999), pues los pacientes mueren generalmente de neumonía, de paro respiratorio, de infarto al miocardio o de septicemia (Forstl y Kurz, 1999).

2.1.3 Alteraciones de la función olfatoria durante la EA

El sistema olfatorio es el único sistema sensorial que transmite su información directamente a la corteza cerebral sin hacer relevo en el tálamo (Shepherd *et al.*, 1972). Además, el sistema olfatorio establece una relación estrecha con el sistema límbico (Shepherd *et al.*, 1972; Thompson *et al.*, 1998). Es importante resaltar que uno de los síntomas más tempranos de la EA, es la alteración en la capacidad olfativa (Thompson *et al.*, 1998; Mesholam *et al.*, 1998; Wesson *et al.*, 2010b). De hecho, se ha propuesto que el deterioro olfativo pudiera utilizarse como método diagnóstico temprano de la EA y, de esta forma, poder generar tratamientos preventivos que disminuyan la pérdida de las funciones cognitivas en los pacientes (Warner, 1986). La olfacción está involucrada en procesos de memoria y aprendizaje, por lo que, el deterioro de este sistema también puede ser considerado como un predictor de la alteración de los procesos cognitivos (Thompson *et al.*, 1998). Estudios de Warner *et al.*, (1986), en los que se utilizó la prueba denominada “*The Smell Identification Test Administration Manual*”, que consiste en la discriminación e identificación olfativa de 40 olores, y que tiene la finalidad de determinar el rango de sensación y percepción olfativa en humanos; comprobaron que los pacientes catalogados con una demencia de tipo EA, presentan un número mayor de errores en la identificación de olores y que este deterioro correlaciona con el grado de demencia de los pacientes. En otro estudio realizado por Schofield *et al.*, (2012), demostraron que existe una correlación entre el deterioro olfativo y la disminución en el volumen hipocampal, en los pacientes con EA intermedia.

El deterioro olfativo en la EA puede deberse a alteraciones en diversas estructuras olfatorias (Wesson *et al.*, 2010b; Bahar-Fuchs *et al.*, 2010; Arnold *et al.*, 2010), como el núcleo olfatorio anterior y el nervio craneal olfatorio, que muestran cambios neurodegenerativos durante la etapa avanzada de la EA (Averback, 1983; Bahar-Fuchs *et al.*, 2010). Asimismo, Esiri y Wilcock (1984), reportan no haber encontrado placas insolubles de la A β en el bulbo olfatorio, al menos en las etapas tempranas de la EA, por lo que se ha sugerido que la

proteína A β en estado soluble es la responsable de las alteraciones en la funcionalidad del bulbo olfatorio de los humanos (Ohm y Braak, 1997).

Estudios dirigidos a la identificación de los genes responsables de la EA de tipo familiar han permitido el desarrollo de ratones transgénicos que simulan alteraciones que semejan a la EA (Wesson *et al.*, 2010b; Oddo *et al.*, 2003; Bittner *et al.*, 2010). Entre las alteraciones tempranas que se observan en los ratones transgénicos de la EA se encuentra una disminución de su capacidad olfatoria (Kawarabayashi *et al.*, 2001; Wesson *et al.*, 2010b; Cassano *et al.*, 2011; Coronas-Sámamo, 2011). Wesson *et al.*, (2010b) demostraron que ratones transgénicos que expresan una forma mutada de la proteína precursora de β amiloide (APP 695), sobreproducen la proteína A β en el bulbo olfatorio y poseen un desempeño bajo en pruebas de discriminación olfativa. La correlación que guarda la cantidad A β soluble y el deterioro temprano en la capacidad olfativa ha sugerido una relación causal entre esta proteína y el deterioro olfativo que presentan tanto los pacientes con EA como los ratones transgénicos en las etapas tempranas de la EA (Hsiao *et al.*, 1996; Kawarabayashi *et al.*, 2001; Wesson *et al.*, 2010b).

Con base en estos antecedentes, se ha sugerido que la disminución olfatoria que ocurre en las etapas tempranas de la EA no está asociada a la presencia del estado insoluble de la A β (placas amiloideas), sino a alteraciones producidas por la A β soluble sobre los circuitos neuronales del BOP (Ohm y Braak, 1997; Wesson *et al.*, 2010a; Koike *et al.*, 2011). Por ello, consideramos que es importante estudiar el efecto de esta proteína sobre el BOP y los mecanismos que subyacen a este efecto.

2.1.4 Histopatología de la EA

Histopatológicamente, la EA se caracteriza por una pérdida progresiva de las neuronas en el hipocampo y la corteza cerebral, principalmente, aunque no exclusivamente (Selkoe, 2001; Mena-López *et al.*, 2003). Sin embargo, esta pérdida progresiva de neuronas también se ha observado en el bulbo olfatorio

(Christen-Zaech *et al.*, 2003). Además, la EA se caracteriza por la presencia de dos marcadores histopatológicos característicos y diagnósticos, que son las marañas neurofibrilares y las placas amiloideas (Tolnay y Probst, 2003; Barber, 2010). De hecho, el diagnóstico definitivo de la EA se realiza mediante un examen del tejido cerebral *post-mortem* que confirma la presencia de ambos marcadores (Mena-López *et al.*, 2003; Blennow *et al.*, 2006). Las marañas neurofibrilares intracelulares están conformadas por la proteína tau y las placas seniles extracelulares son agregados compuestos principalmente por la proteína beta-amiloide (A β) (Selkoe, 2001; Mena-López *et al.*, 2003; Blennow *et al.*, 2006).

2.1.4.1 Las marañas neurofibrilares

Las marañas neurofibrilares se producen por la agregación, en un estado insoluble, de la proteína tau hiperfosforilada (Iqbal *et al.*, 1986), que se acumula en el interior de las neuronas (Iqbal *et al.*, 1986) y compromete la función del citoesqueleto (Iqbal *et al.*, 1986). La proteína tau está asociada a los microtúbulos y presenta 6 isoformas en humanos y ratas (Wang y Liu, 2008), tau se localiza principalmente en los axones (Binder *et al.*, 1985) y su función principal es la estabilización del citoesqueleto a través de la polimerización de la tubulina (Drechsel *et al.*, 1992). La hiperfosforilación de la proteína tau evita su interacción con los microtúbulos y promueve su agregación en formas fibrilares (Lovestone y Reynolds, 1997).

2.1.4.2 La proteína β Amiloide (A β)

La A β se produce a partir de la hidrólisis de la proteína precursora del amiloide (APP), que es una proteína de membrana codificada por un gen que se localiza en el cromosoma 21 en los humanos (Zhang *et al.*, 2011). La APP se presenta mayoritariamente en tres isoformas, la APP695, la APP751 y la APP770, que difieren en la longitud de su cadena polipeptídica y de la cual reciben su nombre

(Zhang *et al.*, 2011; Kojro *et al.*, 2001). La isoforma APP695 se encuentra principalmente en las neuronas y en las células gliales (Zhang *et al.*, 2011), mientras que las isoformas APP751 y APP770 se encuentran distribuidas en un gran número de tejidos como en el tejido adiposo, el tejido hepático y el tejido cardíaco, entre otros (Zhang *et al.*, 2011). La APP es una glicoproteína de membrana altamente conservada, cuyo procesamiento proteolítico es determinado por la acción de distintas secretasas (García-Osta y Alberini, 2009).

Existen dos vías de procesamiento de la APP que son la vía no amiloidogénica en la que participan las α - y γ -secretasas y que produce varios péptidos, pero no a la A β (Kojro *et al.*, 2001; García-Osta y Alberini, 2009); así como la vía amiloidogénica que involucra a las β - y γ -secretasas, y que genera varios péptidos incluida la A β (Fig.1, Kojro *et al.*, 2001; Selkoe, 1993).

La A β producida por el procesamiento amiloidogénico de la APP, puede constar de 39 a 42 aminoácidos (Kojro *et al.*, 2001). Sin embargo, la A β ₁₋₄₀ es la forma más común en condiciones fisiológicas, mientras que la A β ₁₋₄₂ es la que incrementa mayormente su síntesis durante la EA (Kojro *et al.*, 2001). Además, la A β ₁₋₄₂ es la isoforma que tiende a formar más oligómeros y, por consecuencia, a precipitarse en formas fibrilares con mayor facilidad (Zhang *et al.*, 2011).

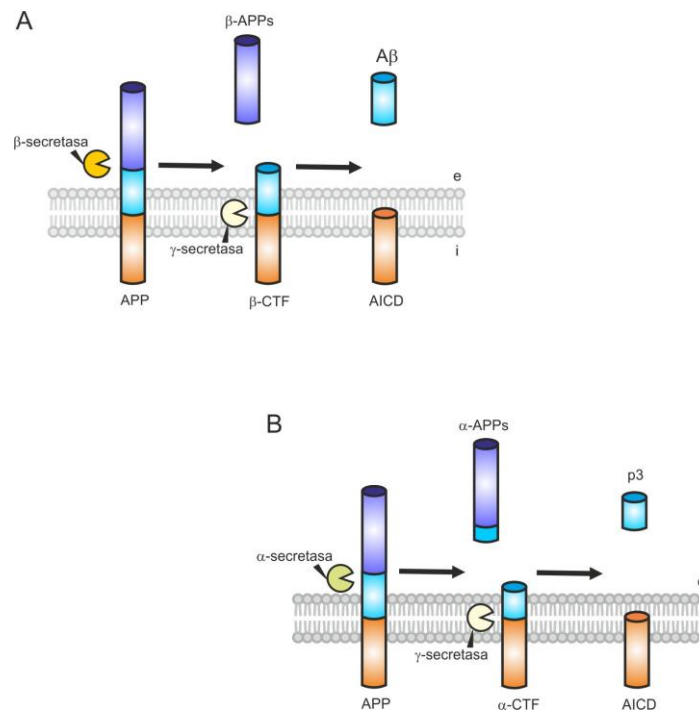


Figura 1 – Procesamiento de la proteína precursora de beta amiloide APP. A) Vía amiloidogénica. La enzima proteolítica β-secretasa genera el fragmento soluble de la APP β (β-APPs; por sus siglas en inglés) y el Fragmento Carboxilo Terminal β (β-CTF; por sus siglas en inglés). Posteriormente, la γ-secretasa corta el fragmento β-CTF en la porción intermembranal generando el Dominio Intracelular de la APP (AICD; por sus siglas en inglés) y la Aβ. B) En la vía no-amiloidogénica participa la α-secretasa generando los fragmentos α-APPs y α-CTF, subsecuentemente la γ-secretasa genera los péptidos p3 y AICD a partir del α-CTF. i = intracelular; e = extracelular (tomado de Balleza-Tapia, 2015).

Las placas seniles, también llamadas placas β amiloideas, se presentan en dos formas: Las placas neuríticas, que tienen un diámetro de 10 a 120 micras y están conformadas por un núcleo denso de Aβ₁₋₄₀ y, principalmente, de Aβ₁₋₄₂ en su forma fibrilar (Jarrett *et al.*, 1993; Selkoe, 2001). Estas placas están rodeadas por una cantidad alta de microglía activada que se ubica en la región más cercana al núcleo de las mismas, mientras que la parte exterior de la placa es encapsulada por neuritas distróficas así como por astrocitos reactivos (Selkoe, 2001). Por otra parte, existen las placas difusas que deben su nombre a que no tienen una estructura central compacta y tampoco se encuentran rodeadas de neuritas distróficas (Selkoe, 2001). Debido a su estructura, se piensa que estas placas son

precursoras de las placas neuríticas (Selkoe, 2001).

2.2 Función fisiológica de la proteína A β

La proteína A β parece desempeñar un papel fisiológico en diversos procesos celulares (Yanker *et al.*, 1990; Plant *et al.*, 2003; Parihar y Brewer, 2010). Por ejemplo, concentraciones fisiológicas de la proteína A β promueven el crecimiento, mantenimiento y la extensión de las neuritas (García-Osta y Alberini, 2009), regula la plasticidad sináptica y promueve el aprendizaje y la memoria (García-Osta y Alberini, 2009; Kang *et al.*, 2009; Parihar y Brewer, 2010). Es importante señalar que, en condiciones fisiológicas, la concentración de la proteína A β se encuentra en el rango de los 200 a los 1000 picomolar, siendo más abundante la isoforma 1-40 que la isoforma 1-42 (García-Osta y Alberini, 2009; Cirrito *et al.*, 2008; Ramsden *et al.*, 2002). Resulta interesante que la presencia de la A β en el hipocampo, en condiciones fisiológicas, no es constante, ya que su liberación sigue un patrón circadiano dependiente del ciclo sueño-vigilia, tanto en ratones como en humanos (Kang *et al.*, 2009). Como ya se mencionó, las concentraciones basales de la A β son necesarias para la sobrevivencia de las neuronas, por lo que en cultivos neuronales, la inhibición de la síntesis de la A β provoca la muerte de dichas células (Yanker *et al.*, 1990; Plant *et al.*, 2003). Por otra parte, la presencia de la A β en cultivos de células troncales, promueve un mayor grado de diferenciación neuronal, así como un mayor crecimiento de las proyecciones axonales y dendríticas (López-Toledano y Shelanski, 2004). De esta manera, se propone que la A β es un factor neurotrófico y neuroprotector en condiciones fisiológicas (Yanker *et al.*, 1990; Plant *et al.*, 2003).

Otra de las funciones fisiológicas que se le han atribuido a la A β es la modulación de la transmisión mediada por la acetilcolina (ACh), a través de la interacción directa con los receptores nicotínicos (nAChR) de tipo $\alpha 7$ (Wang *et al.*, 2000; Dineley *et al.*, 2002). La activación de los nAChR por la proteína A β , a concentraciones fisiológicas, puede desencadenar cambios en la transmisión sináptica tanto a nivel presináptico como postsináptico (Jürgensen y Ferreira,

2010). La entrada de Ca^{+2} a través de los nAChR en la presinapsis, promueve el reclutamiento y liberación de las vesículas sinápticas; mientras que en la postsinapsis, la activación de los nAChR disminuye el umbral de activación de los receptores glutamatérgicos tipo NMDA, además de que aumenta la excitabilidad neuronal (Mckay *et al.*, 2007; Dineley *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2000). Por otro lado, experimentos de Cirrito *et al.*, (2005) sugieren que la A β regula la actividad sináptica al ser liberada, de manera dependiente de la actividad, al líquido intersticial (ISF por sus siglas en inglés). Asimismo, Snyder *et al.*, (2005) ha demostrado que la aplicación de la A β promueve la endocitosis de los receptores de NMDA en las neuronas corticales y, de esta manera, funciona como un regulador de la actividad neuronal (Snyder *et al.*, 2005). Además, la reducción de la A β debido a un tratamiento con un inhibidor de la γ -secretasa restaura los niveles de expresión de los receptores NMDA, lo que sugiere que la aplicación de la A β produce una depresión rápida y persistente de las corrientes evocadas por NMDA en las neuronas corticales (Snyder *et al.*, 2005).

2.2.1 Neuropatología inducida por la proteína A β soluble

Algunas investigaciones han relacionado el grado de demencia temprana en los pacientes con EA con el aumento en la concentración de la A β soluble en el líquido intersticial (Näslund *et al.*, 2000; Grimmer *et al.*, 2009). Por ejemplo, Näslund *et al.*, en el 2000, demostraron que existe una correlación entre el grado de demencia observado en pacientes con EA y los niveles de la A β soluble en diversas regiones de la corteza cerebral. Esta correlación no se observa con la cantidad de placas seniles, ni con la neurodegeneración en los pacientes con EA temprana (Lue *et al.*, 1999; Näslund *et al.*, 2000). Como ya se mencionó, la proteína A β_{1-42} es la isoforma que más aumenta durante la EA (Lue *et al.*, 1999; Wang, 2000; Parihar y Brewer, 2010), además de ser la isoforma más tóxica (García-Osta y Alberini, 2009; Parihar y Brewer, 2010) y la que presenta un mayor nivel de agregación (Burdick *et al.*, 1992; García-Osta y Alberini, 2009; Parihar y Brewer, 2010). La isoforma A β_{1-42} , en concentraciones nanomolares provoca, entre muchas otras

cosas, la endocitosis de los receptores postsinápticos de glutamato tipo NMDA (Cirrito *et al.*, 2005), la depresión de la transmisión sináptica (Yanker *et al.*, 1990; Plant *et al.*, 2003; Vargas-Caballero, 2011), la sinaptotoxicidad (Plant *et al.*, 2003) y, en última instancia, la muerte neuronal (DeKosky *et al.*, 1996; Snyder *et al.*, 2005). La A β , en concentraciones patológicas (mayores a nM), puede interactuar con proteínas involucradas en el transporte y fusión vesicular, como la sinaptofisina y la sinaptobrevina, disminuyendo así la probabilidad de liberación de los neurotransmisores (Masliah *et al.*, 1991; DeKosky *et al.*, 1996). La A β , a estas concentraciones elevadas, también afecta el proceso de re-vesiculación (Sullivan, 2006).

Con respecto a los procesos de plasticidad sináptica, la proteína A β soluble puede inhibir el establecimiento de la potenciación de largo plazo (LTP, por sus siglas en inglés; Lambert *et al.*, 1998), efecto dependiente de la presencia de la proteína tau (Shipton *et al.*, 2011). Esta alteración en la LTP inducida por la A β parece relacionarse con una alteración en el desempeño en tareas de memoria y aprendizaje (Bennett, 2000; Hsiao *et al.*, 1996; Roberson *et al.*, 2007; Salgado-Puga y Peña-Ortega, 2015). Además, el incremento prolongado de la A β soluble puede exacerbar otro tipo de plasticidad sináptica denominada Depresión de Largo Plazo (LTD, por sus siglas en inglés, Hsieh *et al.*, 2006; Shankar *et al.*, 2008; Salgado-Puga y Peña-Ortega, 2015), que eventualmente produce la retracción de las espinas dendríticas (Hsieh *et al.*, 2006; Lacor *et al.*, 2007) y que se ha relacionado con un desempeño menor en tareas de aprendizaje y memoria (Puzzo *et al.*, 2008; García-Osta y Alberini, 2009; Puzzo *et al.*, 2011; Salgado-Puga y Peña-Ortega, 2015).

2.2.2 Alteraciones funcionales producidas por la proteína A β en los circuitos neuronales

El deterioro cognoscitivo en las etapas tempranas de la EA parece estar asociado a alteraciones en la funcionalidad de las redes neuronales inducidas por las formas solubles de A β , más que a la neurotoxicidad asociada a las formas

fibrilares (Peña-Ortega, 2013; Salgado-Puga y Peña-Ortega, 2015). Las oscilaciones neuronales y la actividad espontánea poblacional de varios circuitos neuronales se alteran en presencia de la proteína A β (Adaya-Villanueva *et al.*, 2010; Balleza-Tapia *et al.*, 2010; Colom *et al.*, 2010; Peña-Ortega y Bernal-Pedraza, 2012; Alvarado-Martínez *et al.*, 2013). Este efecto depende de la disminución de la transmisión sináptica (Rowan *et al.*, 2004; 2007; Shankar *et al.*, 2007; Nimrich *et al.*, 2008), así como de la alteración de las propiedades de disparo de las neuronas producidas por la A β (Yun *et al.*, 2006; Orban *et al.*, 2010).

Se ha propuesto que el deterioro en las oscilaciones cerebrales producido por la A β está íntimamente relacionado con la afectación de diversos procesos cognoscitivos (Peña-Ortega, 2013; Salgado-Puga y Peña-Ortega, 2015). Las oscilaciones cerebrales son el resultado de la dinámica de las redes neuronales y dependen de la actividad de las neuronas y de las conexiones entre ellas (Artieda *et al.*, 2009). Por lo tanto, una alteración en la dinámica de las redes neuronales responsables de la generación de las oscilaciones, puede ser la base fisiopatológica de los problemas cognoscitivos observados en los pacientes con la EA (Peña-Ortega, 2013; Salgado-Puga y Peña-Ortega, 2015).

En los últimos años, se ha demostrado que los oligómeros solubles de la A β son capaces de alterar el funcionamiento de los circuitos neuronales (Villete *et al.*, 2010; Peña-Ortega *et al.*, 2010; 2012). Reportes de nuestro laboratorio, han demostrado que la aplicación de la A β soluble es capaz de disminuir la actividad espontánea del hipocampo y del bulbo olfatorio en rebanadas de cerebro de ratón (Balleza-Tapia *et al.*, 2010; Alvarado-Martínez *et al.*, 2013). Por otra parte, experimentos realizados *in vivo*, indican que la administración de la A β soluble, disminuye la potencia de las oscilaciones espontáneas en el hipocampo (Colom *et al.*, 2010; Peña-Ortega y Bernal-Pedraza, 2012). La afectación en la actividad espontánea en el hipocampo, repercute en la disminución del desempeño de los animales en tareas de aprendizaje y memoria (Nakamura *et al.*, 2001; McNaughton *et al.*, 2006) y, en el caso del bulbo olfatorio, induce un deterioro en la detección de odorantes volátiles (Alvarado-Martínez *et al.*, 2013).

2.2.3 Señalización intracelular activada por la A β

Los mediadores bioquímicos involucrados en los efectos deletéreos producidos por la A β están todavía por determinarse (Balleza-Tapia y Peña, 2009). La A β no posee receptores específicos (Balleza-Tapia y Peña, 2009), pero es capaz de interactuar con una variedad amplia de receptores de membrana y, de esta manera, activar cascadas de señalización intracelular tanto en las neuronas como en las células gliales (Verdier y Penke, 2004; Verdier *et al.*, 2004; Balleza-Tapia y Peña, 2009). Entre los receptores que la A β puede activar en las neuronas se encuentran:

1) Receptores ionotrópicos, como los receptores para glutamato tipo NMDA (NMDA-R) (Cullen *et al.*, 1996; De Felice *et al.*, 2007; Domínguez *et al.*, 2007; Abbott *et al.*, 2008; Texido *et al.*, 2011) y receptores nicotínicos $\alpha 7$ ($\alpha 7$ nAChR) (Wang *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2000; Dineley *et al.*, 2001; Kihara *et al.*, 2001; Shimohama y Kihara 2001; Dineley *et al.*, 2002; Shaw *et al.*, 2002).

2) Receptores con actividad intrínseca de cinasa de tirosinas como el receptor para la insulina (IR) (Xie *et al.*, 2002; Townsend *et al.*, 2006; 2007; Zhao *et al.*, 2008).

3) Receptores de citocinas como el receptor 75 para neurotrofinas (p75NRT) (Tsukamoto *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2003; Hashimoto, 2004; Costantini *et al.*, 2005; Costantini *et al.*, 2005; Susen y Blochl, 2005) y el receptor para el factor de necrosis tumoral 1 (TNF-R1) (Li *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2005; Rowan *et al.*, 2004; 2007).

4) Receptores de adhesión como las integrinas (Anderson y Ferreira, 2004; Bozzo *et al.*, 2004).

Las vías transduccionales activadas por muchos de estos receptores llevan, eventualmente, a la activación de la cinasa de la cinasa de la glicógeno sintasa tipo 3 (GSK3; por sus siglas en inglés) (Balleza-Tapia y Peña, 2009), enzima que es fundamental para muchos de los efectos deletéreos producidos por la A β (Balleza-Tapia y Peña, 2009; Peña-Ortega *et al.*, 2012).

2.3 La cinasa de la glicógeno sintasa tipo 3 (GSK3)

La cinasa de la glicógeno sintasa tipo 3 (GSK3; por sus siglas en inglés) es una cinasa de serinas y treoninas que fue descrita inicialmente como una enzima reguladora del metabolismo celular, debido a que fosforila e inhibe a la enzima glicógeno sintasa (Embi *et al.*, 1980). No obstante, la GSK3 actúa también como una enzima central en diferentes vías de señalización (Grimes y Jope, 2001; Woodgett, 2001), asociadas a diversas funciones celulares como el metabolismo del glucógeno (Embi *et al.*, 1980; Orena *et al.*, 2000; Grimes y Jope, 2001), la regulación del ciclo celular (Ryves y Harwood, 2003), la sobrevivencia (Pap y Cooper, 1998; Pap y Cooper, 2002; Maurer *et al.*, 2014) y la proliferación celular (Force y Woodgett, 2009; Shin *et al.*, 2011).

En el sistema nervioso se ha encontrado que esta enzima es inhibida durante la inducción de la LTP y es activada durante la inducción de la LTD (Peineau *et al.*, 2007). La activación de la GSK3 fomenta la LTD al inducir la endocitosis de los receptores de glutamato tipo AMPA (Peineau *et al.*, 2007). Este hecho es de particular interés, ya que el desbalance entre la LTP y la LTD es responsable del deterioro en el almacenamiento de la memoria descrito en la EA (Bradley *et al.*, 2012). Adicionalmente, Lucas *et al.*, (2001) y Hernández *et al.*, (2002) han mostrado que la sobreexpresión de la GSK-3 en las neuronas del hipocampo de ratón produce un deterioro en la resolución de una prueba de memoria espacial (el laberinto de Morris), mientras que la restauración de los niveles de GSK3 revierte dicho deterioro en la ejecución de la memoria espacial.

Es importante mencionar que el mal funcionamiento de la GSK3 ha sido involucrado en el desarrollo de diversos tipos de enfermedades somáticas, como

la diabetes (Nikoulina *et al.*, 2000; Henriksen *et al.*, 2003; Henriksen y Dokken, 2006) y el cáncer (Polakis, 2000; Taipale y Beachy, 2001; Manoukian y Woodgett, 2002); así como con enfermedades neurológicas, como el desorden bipolar (Detera-Wadleigh, 2001; Gould y Manji, 2002), la esquizofrenia (Koros y Dorner-Ciossek, 2007) y la EA (Balaraman *et al.*, 2006; Hooper *et al.*, 2008; Kremer *et al.*, 2011). Lo anterior se debe a que la GSK3 se expresa en todos los tejidos del cuerpo (Woodgett, 1990; Leroy y Brion, 1999), aunque su nivel más alto de expresión se encuentra en el sistema nervioso central (Woodgett, 1990; Leroy y Brion, 1999).

2.3.1 Estructura de la GSK3 y la regulación de su actividad

Existen dos isoformas de la GSK3 que se codifican en distintos genes (Woodgett, 1990), las denominadas GSK3 α y la GSK3 β que poseen una masa de 51 y 47 kDa, respectivamente (Woodgett, 1990). La estructura del sitio catalítico de la GSK3 es muy similar en ambas isoformas (Doble y Woodgett, 2003) y la diferencia principal entre ellas radica en el terminal amino de la GSK3 α que posee una región extra rica en glicinas (Woodgett, 1990). En el dominio catalítico de ambas enzimas se ubica un pequeño dominio de unión (BD; por sus siglas en inglés) que le permite a la GSK3 interactuar con otras proteínas y sustratos (Doble y Woodgett, 2003). La GSK3 está constitutivamente activa en la mayoría de las células y es regulada negativamente por las vías transduccionales que activan a la PI3K y a la Akt (Doble y Woodgett, 2003). Esta última, inhibe la actividad de la GSK3 a través de la fosforilación de las serinas 9 y 21 (en la GSK3 α y la GSK3 β , respectivamente) en la terminal amino (Plyte *et al.*, 1992; Cross *et al.*, 1995).

De manera contraria, la fosforilación en las tirosinas 216 (GSK3 α) y 279 (GSK3 β) aumenta la actividad de las GSK3 (Hughes *et al.*, 1993). La fosforilación de las tirosinas mencionadas no es necesaria para la activación de la cinasa o para su función catalítica (Thomas *et al.*, 1999; Dajani *et al.*, 2001), pero sí aumenta su eficiencia de fosforilación (Thomas *et al.*, 1999; Dajani *et al.*, 2001). La fosforilación de las serinas 9 y 21 de la GSK3 α/β , respectivamente, crea un

pseudosustrato que se une intramolecularmente al dominio catalítico de la cinasa inhibiendo así su actividad catalítica (Thomas *et al.*, 1999).

2.3.2 La cinasa GSK3 y la EA

Existen evidencias de la participación de la cinasa de serinas/treoninas GSK3 β en la fisiopatología de la EA (Balaraman *et al.*, 2006; Hooper *et al.*, 2008; Kremer *et al.*, 2011). Por ejemplo, se ha observado un incremento tanto en la actividad de la GSK3 β en la corteza frontal (Leroy *et al.*, 2007), como en su expresión en el hipocampo de pacientes con EA (Blalock *et al.*, 2004). Por otra parte, se ha observado una disminución en la muerte neuronal inducida por la A β cuando se utilizan oligonucleótidos específicos para evitar la expresión de la GSK3 β (Takashima *et al.*, 1996). También, existe evidencia de que la inhibición farmacológica de la GSK3 β con litio y con el inhibidor VIII de la GSK3 β , previene la sobrefosforilación de la proteína tau y la muerte neuronal mediada por la A β (Álvarez *et al.*, 1999; Koh *et al.*, 2008). Finalmente, resultados recientes de nuestro laboratorio han demostrado que la proteína A β es capaz de inhibir las oscilaciones beta-gamma en la corteza entorrinal a través de un mecanismo que requiere de la activación de la cinasa GSK3 β (Peña-Ortega *et al.*, 2012) y que el ejercicio físico protege la actividad oscilatoria del hipocampo contra los efectos de la A β a través de inhibir la activación de la GSK3 β (Isla *et al.*, 2016).

Uno de los blancos de la GSK3 es la proteína tau (Ávila *et al.*, 2003) que, como ya se mencionó, una vez fosforilada muestra una disminución en su afinidad por los microtúbulos, lo que provoca la desestabilización de los mismos (Lovestone *et al.*, 1996; Sánchez *et al.*, 2000). Esta desestabilización de los microtúbulos es perjudicial para el mantenimiento del transporte axonal (Sergeant *et al.*, 2008), lo que ocasiona un deterioro en la función neuronal que compromete el aprendizaje y la memoria espacial (Liu *et al.*, 2003). La proteína tau, que pertenece al grupo de proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs, por sus siglas en inglés) (Amos, 2014), será descrita a continuación.

2.4 La proteína tau

Muchas de las características morfológicas y funcionales de los microtúbulos dependen de una serie de proteínas estructurales llamadas, en conjunto, proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs) (Amos, 2014). Como su nombre lo indica, estas proteínas están físicamente asociadas a los microtúbulos y su función es proporcionarles estabilidad y mantener la integridad física de los mismos (Amos, 2014). Las MAPs presentan dominios de unión a microtúbulos en la parte C-terminal (Amos, 2014). La actividad de estas MAPs se modula en función de su grado de fosforilación; pues mientras más fosforilación presenten, menor será su capacidad para estabilizar a los microtúbulos (Amos, 2014). Alteraciones en el funcionamiento de las MAPs pueden contribuir a la aparición de procesos patológicos como la demencia frontotemporal y la enfermedad de Parkinson (Amos, 2014), que se asocian con la presencia de los mismos agregados de tau presentes en la EA (Magnani *et al.*, 2007). Para este estudio, es de vital importancia una de estas proteínas estabilizadoras de microtúbulos llamada tau, la cual describiremos a continuación.

En 1977 DW Cleveland purificó, por primera vez, a la proteína tau que, es una proteína que pertenece a la familia de las MAPs (Amos, 2014). La proteína tau fue descubierta como una proteína asociada a microtúbulos (MAP) que estimula el ensamble de tubulina en el citoesqueleto de las neuronas (Harada *et al.*, 1994). Esta proteína ha cobrado importancia debido a que las MAPs son el componente principal de los filamentos helicoidales pareados (PHFs) o marañas neurofibrilares (NTFs) (Liu *et al.*, 2007). La proteína tau participa en algunas funciones biológicas en el sistema nervioso central (Harada *et al.*, 1994). La función más importante de la proteína tau es la de promover el ensamble de los microtúbulos y la de mantener la estabilidad de los ya formados previamente, lo que es indispensable para el transporte axonal de las neuronas (Harada *et al.*, 1994). La afectación de esta función puede ocasionar un deterioro en el aprendizaje y en la memoria espacial (Liu *et al.*, 2003).

2.4.1 La estructura y función de la proteína tau

La proteína tau en humanos adultos se expresa en seis isoformas diferentes que son codificadas a partir de un mismo gen (Goedert *et al.*, 1989), el cual se localiza en el cromosoma 17 (Magnani *et al.*, 2007). Las diferentes isoformas son producidas por *splicing* alternativo del ARNm difieren en la presencia, o ausencia, de una o dos secuencias de 29 a 58 aminoácidos en el N-terminal y por la presencia o ausencia de tres o cuatro secuencias repetidas, en el carboxilo terminal, que son los dominios de unión a los microtúbulos (Harada *et al.*, 1994). Las isoformas de tau que contienen cuatro repeticiones de la secuencia de unión a microtúbulos son más eficientes en la promoción del ensamblaje de los microtúbulos que aquellas que presentan sólo tres repeticiones de esta secuencia (Spillantini y Goedert, 2013). En la corteza cerebral de adultos sanos se observan cantidades iguales de tau con 3 y 4 repeticiones de la secuencia de unión a microtúbulos en el carboxilo-terminal (Fig. 2, Spillantini y Goedert, 2013).

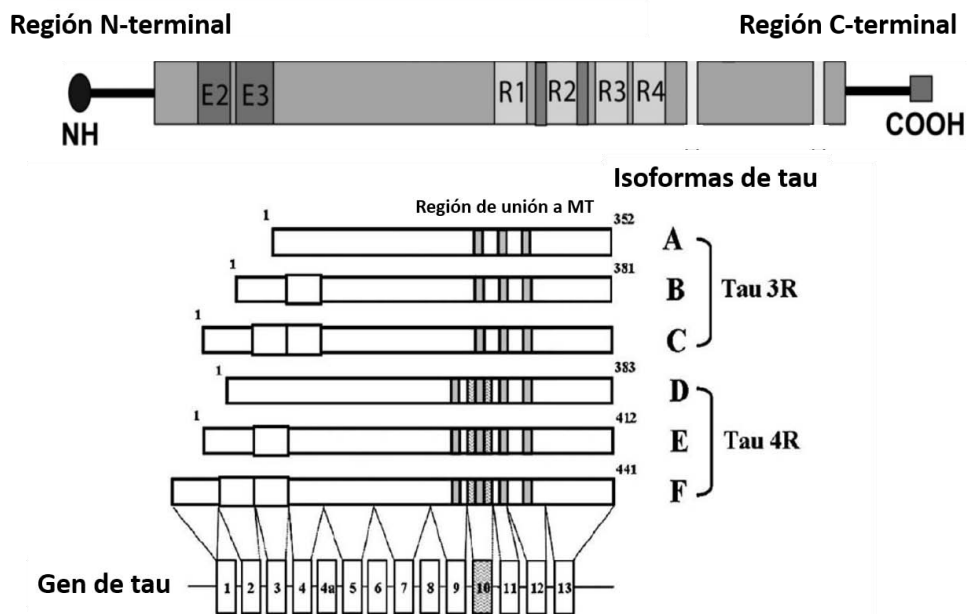


Figura 2. Estructura de la proteína tau. En el panel superior se muestra la estructura de la proteína tau con las secuencias repetidas de unión a microtúbulos (R1, R2, R3 y R4) en la región carboxilo (COOH). En el panel inferior podemos observar las 6 isoformas (A-F) de la proteína tau generadas por *splicing* alternativo con 3 (Tau 3R) ó 4 (Tau 4R) regiones repetidas para el ensamblaje a microtúbulos (modificado de Mondragón *et al.*, 2014).

La expresión de tau es aproximadamente dos veces mayor en la materia gris de la corteza cerebral que en la materia blanca (Spillantini y Goedert, 2013). En neuronas, la proteína tau se concentra en los axones (Spillantini y Goedert, 2013). Sin embargo, trabajos recientes sugieren que tau está presente también en las dendritas (Spillantini y Goedert, 2013). Frandemiche *et al.*, (2014) demostró que la proteína tau muestra una amplia distribución en las dendritas y que, ante la entrada sináptica, se desplaza desde el eje dendrítico hacia los compartimentos postsinápticos en cultivos primarios y en rebanadas de hipocampo (Frandemiche *et al.*, 2014). Esta translocación de la proteína tau, dependiente de la actividad, aumenta el acople entre la PSD-95, los receptores AMPA y Glu-A1, así como la actina (Frandemiche *et al.*, 2014). Esto sugiere que la proteína tau tiene un papel en la plasticidad sináptica (Frandemiche *et al.*, 2014). Por otro lado, Frandemiche *et al.*, (2014) han reportado que la A β provoca una translocación de la proteína tau hacia las espinas dendríticas sin necesidad de activación sináptica en neuronas corticales. Este reacomodo de la proteína tau es también un rasgo característico observado en la EA (Tai *et al.*, 2012), la demencia frontotemporal (FTD) y el parkinsonismo ligado al cromosoma 17 (FTDP-17) (Hoover *et al.*, 2010).

2.4.2 Las Taupatías

Además de la EA, la hiperfosforilación de la proteína tau ha sido observada en varias enfermedades neurodegenerativas como la demencia frontotemporal con Parkinsonismo (FTDP-17) y la enfermedad de Pick (Ávila *et al.*, 2004), la cual provoca la muerte progresiva de las células del sistema nervioso central, a través de la formación los "cuerpos de Pick" (principalmente en los lóbulos cerebrales frontal y temporal), formados principalmente por la acumulación de la proteína tau (Ávila *et al.*, 2004). Lo anterior agrupa a todas estas enfermedades como taupatías (Magnani *et al.*, 2007). El efecto negativo de la hiperfosforilación de tau radica en que puede competir con la proteína motora cinesina en el ensamble de los microtúbulos, dando como resultado una disminución del transporte axonal

(Harada *et al.*, 1994).

En autopsias de cerebros de pacientes con EA, los niveles de fosforilación de la proteína tau son tres o cuatro veces mayor que los encontrados en cerebros de individuos sanos (Grundke-Iqbal *et al.*, 1984). Como ya se mencionó, la caracterización de los filamentos helicoidales pareados (PHFs, por sus siglas en inglés) de cerebros de sujetos con EA mostró que la proteína tau es el componente proteico principal de las PHFs y que la proteína tau que los integra se encuentra anormalmente hiperfosforilada (Grundke-Iqbal *et al.*, 1986a; Wood *et al.*, 1986). La hiperfosforilación de la proteína tau juega un papel principal en las enfermedades neurodegenerativas, especialmente en la EA, donde se pueden apreciar cambios neurofibrilares que consisten en la formación de ovillos neurofibrilares, filamentos de neuropilo y la formación de placas seniles neuríticas (Goedert *et al.*, 1993); que aparecen dentro de la gran mayoría de las células nerviosas que degeneran durante el curso de la enfermedad (Goedert *et al.*, 1993). La cantidad de estos marcadores histopatológicos correlaciona con la demencia (Goedert *et al.*, 1993).

Tanto la expresión, como la fosforilación de la proteína tau son reguladas durante el desarrollo (Goedert *et al.*, 1993). En etapas embrionarias y en el periodo temprano postnatal, las isoformas cortas de la proteína tau presentan un alto nivel de fosforilación (Goedert *et al.*, 1993), lo que disminuye en el cerebro adulto saludable (Goedert *et al.*, 1993). Estudios cinéticos *in vitro* de las fosforilaciones fisiológicas de la proteína tau sugieren que la fosforilación de las Ser199/Ser202/Thr205, de las Thr212, Thr231/Ser235, de las Ser262/Ser356 y la Ser422 promueven la autoagregación de la proteína para la formación de marañas neurofibrilares (Liu *et al.*, 2007). Además, algunas evidencias señalan que la proteína tau muestra hiperfosforilación en 45 sitios diferentes (Mondragón *et al.*, 2013).

La hiperfosforilación de la proteína tau le confiere propiedades tóxicas, así como la habilidad de secuestrar a la proteína tau “normal” y a otras MAPs, como la MAP1 y la MAP2; lo que causa el desensamble de los microtúbulos (Alonso *et al.*, 2009; 2006; 2004; Morsch *et al.*, 1999; Lovestone *et al.*, 1997). Esta agregación

patológica de la proteína tau durante la EA provoca, entre otras cosas, daño en el transporte axonal de las mitocondrias entre el soma y la sinapsis (Alonso *et al.*, 1994; Morsch *et al.*, 1999; Lovestone *et al.*, 1997), lo que ocasiona deficiencias metabólicas y un desbalance en la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y de especies reactivas de nitrógeno (RNS) (Mondragón *et al.*, 2013), acelerando así el deterioro de la sinapsis y el proceso de neurodegeneración en la EA (Mondragón *et al.*, 2013).

Como ya habíamos mencionado, muchas mutaciones causantes de la EA de tipo genético se encuentran en los genes que codifican la proteína precursora amiloide (APP), la presenilina 1 (PS1) y la presenilina 2 (PS2), lo que da como resultado un aumento de la producción de la A β en el cerebro (Spillantini y Goedert, 2013). Estas mutaciones y sus efectos forman la columna vertebral de la hipótesis amiloide de la Enfermedad de Alzheimer, que postula que la acumulación de la A β produce la hiperfosforilación de tau y su agregación, ocasionando disfunción sináptica y muerte de células nerviosas (Spillantini y Goedert, 2013). De esta forma, es muy importante señalar que gran parte de la hiperfosforilación de la proteína tau es inducida por la presencia de la A β (Roberson *et al.*, 2007). Algunos experimentos han demostrado que la proteína tau es necesaria para el deterioro cognoscitivo inducido por la A β (Hsiao *et al.*, 1996; Roberson *et al.*, 2007), y que la interacción entre las proteínas A β y tau requiere de la fosforilación de esta última por la enzima GSK3 (Shipton *et al.*, 2011). Otra evidencia que señala una interacción importante entre la proteína tau y la A β es la protección del deterioro de la neurodegeneración inducida por la A β en cultivos neuronales que carecen de la proteína tau (Rapoport *et al.*, 2002). Además, Hsiao *et al.* en 1996 demostraron que el deterioro cognitivo provocado por la sobreexpresión de la proteína precursora de beta amiloide humana (hAPP) en ratones transgénicos, no se presenta en ratones que, además, carecen de la proteína tau (Roberson *et al.*, 2007).

Como ya hemos mencionado anteriormente, durante la patogénesis de la EA, el autoensamblaje de los filamentos helicoidales apareados y la marañas neurofibrilares es producido por la hiperfosforilación de la proteína tau (Chen *et al.*,

2013). Existen varias formas de enfrentar el daño inducido por la hiperfosforilación de esta proteína, entre las que se encuentra la reducción de la presencia de esta proteína con ARNs de interferencia (Chen *et al.*, 2013). Algunos experimentos han mostrado que la disminución de los niveles de tau, por este medio, impidió los cambios neuríticos producidos por la presencia de la A β (Chen *et al.*, 2013). Por otro lado, se ha demostrado que la disminución de los niveles de tau con ARNs de horquilla corta (shRNA; por sus siglas en inglés) modula la LTD (Kimura *et al.*, 2014). Estas evidencias muestran que el uso de ARNs interferentes puede ayudar a dilucidar el papel de la proteína tau en varios procesos fisiológicos y patológicos. Otra estrategia para disminuir los niveles de la proteína tau es utilizar un tratamiento con ácido tolfenámico (TA por sus siglas en inglés), el cual reduce los niveles del ARNm de la proteína tau y, por lo tanto, de su proteína (Adwan *et al.*, 2014).

En un estudio realizado por Subaiea *et al.*, (2013) se demostró que la administración de TA 50mg/kg disminuye los niveles de la proteína tau y previene el deterioro cognitivo en ratones transgénicos que sobreexpresan la proteína precursora amiloide. Es importante señalar que la reducción de la expresión de la proteína tau por el tratamiento con TA, se debe a la inhibición, mediada por TA, de un factor de transcripción llamado Sp1 (Adwan *et al.*, 2014). Estos datos han sugerido que el ácido tolfenámico es un agente terapéutico prometedor para tratar la EA (Adwan *et al.*, 2011). En nuestro caso, ambas herramientas experimentales el shRNA y el tratamiento con TA, pudieran ayudarnos a evaluar el papel de la proteína tau en los efectos patológicos producidos por la A β en el bulbo olfatorio, que es uno de los principales objetivos de esta tesis.

Un dato interesante sobre la fisiopatología asociada a la proteína tau es la propagación de las marañas neurofibrilares (NFTs; por sus siglas en inglés) dentro del cerebro en la EA, la cual se ha observado en varias zonas como en la corteza transentorrinal, la corteza entorrinal, la formación del hipocampo y en la isocorteza (Braak *et al.*, 2006; Braak y Braak, 1991). Además, en las primeras etapas de la EA, la formación de NFTs se encuentran en el núcleo olfatorio anterior (AON) (Price *et al.*, 1991) y BOP (Attems *et al.*, 2005; Esiri y Wilcock, 1984; Kovacs *et al.*,

1999; Ohm y Braak, 1987; Tsuboi *et al.*, 2003). También, se ha descrito que la corteza olfatoria principal (la corteza piriforme) muestra alteraciones neuropatológicas asociadas a un deterioro olfativo en las primeras etapas de la EA (Li *et al.*, 2010). Con la progresión de la EA, aumenta la presencia de la proteína tau en comparación con la de la beta-amiloide en el BOP (Attems *et al.*, 2005) y, en un estudio de tejido cerebral procedente de pacientes con EA, se mostró que en el BOP la cantidad de proteína tau es muy alta durante las primeras fases de la EA (Reyes *et al.*, 1993; Mundinano *et al.*, 2011; Mann *et al.*, 1988; Kovacs *et al.*, 2001).

2.5 El bulbo olfatorio principal (BOP)

El sistema olfatorio de la mayoría de los mamíferos consta de dos órganos sensoriales especializados: el epitelio olfatorio (OE, por sus siglas en inglés) y el órgano vomeronasal (VNO, por sus siglas en inglés) (Shepherd, 1972). Además de la diferenciación anatómica entre ambos (Shepherd, 1972), existe una especialización funcional que involucra al OE en la detección preferencial de los olores volátiles y al VNO en la detección preferencial de las feromonas (Shepherd, 1972; Vargas-Barroso *et al.*, 2016). La información proveniente del EO converge en el BOP (Shepherd, 1972), mientras que el bulbo olfatorio accesorio (BOA) procesa la información del VNO (Shepherd, 1972). El BOP, es una estructura telencefálica bilateral encargada de procesar la información olfatoria producida por moléculas pequeñas (Buck, 1996), además de ser el primer relevo en el procesamiento de la información olfatoria hacia las cortezas olfatorias (Shepherd, 1972). El circuito del BOP está organizado en 7 capas (Shepherd, 1972; Nieuwenhuys *et al.*, 2008), que se describen a continuación:

- 1.- La capa más superficial del BOP, denominada capa de los nervios olfatorios, corresponde a los axones de las células neurosensoriales olfatorias en su trayecto hacia sus glomérulos blanco (Shepherd *et al.*, 2004; Nieuwenhuys *et al.*, 2008).

2.-La segunda capa, denominada glomerular, contiene condensaciones esféricas especializadas llamadas glomérulos (alrededor de 2000), de donde procede su nombre (Hudson *et al.*, 1990). En los glomérulos, las terminales de las fibras nerviosas olfatorias hacen sinapsis con las dendritas de las células mitrales y empenachadas (Haberly, 1990; McTavish *et al.*, 2012). Los glomérulos están conformados, además, por las neuronas periglomerulares que actúan como interneuronas locales (Hudson *et al.*, 1990; Shepherd *et al.*, 2004; Nieuwenhuys *et al.*, 2008).

3.- Después de la capa glomerular, aparece la capa plexiforme externa, formada, principalmente, por prolongaciones dendríticas de las neuronas mitrales y de las neuronas empenachadas, que se dirigen hacia los glomérulos, así como las dendritas eferentes que se dirigen hacia las neuronas granulares internas (Shepherd *et al.*, 2004; Nieuwenhuys *et al.*, 2008).

4.- La capa de neuronas mitrales es una lámina delgada con los somas de estas neuronas de proyección (Shepherd *et al.*, 2004; Nieuwenhuys *et al.*, 2008).

5.- Por debajo de la capa de las células mitrales se localiza la capa plexiforme interna, formada por un plexo en el que participan las dendritas ascendentes de las neuronas granulares profundas, los axones de las células mitrales y empenachadas, así como sus colaterales recurrentes, además de los axones de fibras provenientes de diversas regiones corticales (Shepherd *et al.*, 2004; Nieuwenhuys *et al.*, 2008).

6.- La sexta capa del BOP corresponde a la capa granular, formada por neuronas granulares densamente agrupadas que se separan, entre sí, por haces de fibras nerviosas y por interneuronas (Shepherd *et al.*, 2004; Nieuwenhuys *et al.*, 2008).

7.- La última capa del BOP corresponde a una zona ocupada por los axones de las neuronas de proyección (mitrales y empenachadas) y de las proyecciones aferentes provenientes del *locus coeruleus* y de la corteza olfatoria (Hudson *et al.*, 1999; Nieuwenhuys *et al.*, 2008).

La capa granular del BOP juega un papel esencial en el procesamiento bulbar de la información olfatoria, pues regula la integración de la información entrante y la información saliente de este circuito (Shepherd, 1972; Friedman y Strowbridge; 2003; Nieuwenhuys *et al.*, 2008). La activación de las células granulares, por las neuronas mitrales y empenachadas, se produce por la activación de los receptores glutamatérgicos del tipo NMDA; lo que provoca la liberación de GABA hacia el espacio sináptico (Friedman y Strowbridge, 2003; Urban y Arevian, 2009). El GABA proveniente de las células granulares, permite la generación de ventanas periódicas de sincronización en las células mitrales (McTavish *et al.*, 2012). Las células granulares GABAérgicas, además, pueden inhibir a las células mitrales adyacentes, lo que genera la llamada inhibición lateral (Friedman y Strowbridge, 2003; Saghatelyan *et al.*, 2003), misma que modula la integración de la información en esta estructura (Friedman y Strowbridge, 2003; Saghatelyan *et al.*, 2003).

2.5.1 Propiedades electrofisiológicas del BOP y sus alteraciones en condiciones patológicas

Las propiedades eléctricas de los elementos del circuito del BOP, así como las conexiones sinápticas que se establecen entre ellos, le permiten generar patrones oscilatorios espontáneos en diferentes frecuencias (Shepherd, 1972; Kauer, 1988). El BOP es capaz de generar oscilaciones con frecuencias tipo theta (4-12 Hz), tipo beta (15-35 Hz) y tipo gamma (45-90 Hz) (Kay *et al.*, 2010; Wesson *et al.*, 2010a). Estos patrones oscilatorios son considerados la base operacional del BOP, que le permiten la representación y el procesamiento de la información olfatoria (Wachowiak y Shipley, 2006; Kay *et al.*, 2010). El BOP establece relaciones dinámicas con otras estructuras involucradas en el procesamiento olfativo, a

través de la coherencia de sus actividades oscilatorias (Adrián, 1942; Wachowiak y Shipley, 2006; Rojas-Libano y Kay, 2008, Kay y Beshel, 2010). De las oscilaciones antes mencionadas, las frecuencias theta están relacionadas con la recepción del estímulo sensorial, provisto por el ciclo respiratorio y el ingreso de las moléculas volátiles a las narinas (Kay, 2005; Kay y Lazzara, 2010). Además, las oscilaciones theta en el BOP se pueden generar durante tareas de memoria y discriminación olfativa, de manera tal que se encuentran correlacionadas con la actividad del hipocampo (Kay, 2005; Kay y Lazzara 2010). Las oscilaciones tipo beta en el BOP han sido registradas en tareas de aprendizaje y asociación de olores, que involucran actividad correlacionada con la corteza piriforme y la corteza entorrinal (Fontanini y Bower, 2006). Por su parte, las frecuencias de tipo gamma en el BOP están involucradas en el procesamiento sensorial y perceptual de un olor (Kay y Beshel, 2010; Friedman y Strowbridge, 2003).

Se tiene evidencia de que las células de proyección (células mitrales y empenachadas) y las células granulares, juegan un papel esencial en el procesamiento de la información olfatoria (Friedman y Strowbridge, 2003; Urban y Arevian, 2009); interactuando a través de las sinapsis dendrodendríticas, que a su vez son un elemento importante para la generación de los patrones oscilatorios del BOP (Laaris *et al.*, 2007; Urban y Arevian, 2009; McTavish *et al.*, 2012). Las sinapsis dendrodendríticas mantienen una comunicación bidireccional que es excitadora en un sentido e inhibidora en el otro (Saghatelyan *et al.*, 2004), siendo las sinapsis inhibitorias, las que participan mayoritariamente en la generación y sincronización de los patrones oscilatorios en la capa granular del BOP (Friedman y Strowbridge, 2003; Saghatelyan *et al.*, 2004; Arevian *et al.*, 2008).

La alteración de los patrones oscilatorios en el BOP se asocia con la disminución de la capacidad olfatoria (Le Pichon *et al.*, 2009; Martín *et al.*, 2012). Se ha descrito que la alteración de los mecanismos sinápticos dendrodendríticos repercute en alteraciones en la generación de los patrones oscilatorios y, por consecuencia, en la representación, procesamiento y evocación de la información olfativa (Friendman y Strowbridge, 2003; Kay *et al.*, 2008; Wachowiak y Shipley, 2006; Stakic *et al.*, 2011).

También, se ha demostrado que la alteración en la generación de los patrones oscilatorios espontáneos del BOP repercute directamente en la capacidad de procesar la información olfativa, ya que sin ellos simplemente no se puede oler (Le Pichon *et al.*, 2009; Martin *et al.*, 2012). Por todo lo anterior, las oscilaciones poblacionales son fundamentales para el desempeño del BOP ante la estimulación sensorial producida por un odorante, además de ser un buen indicador de la integridad funcional de este circuito (Le Pichon *et al.*, 2009; Martin *et al.*, 2012). Los oligómeros solubles de la A β son capaces de alterar dichos patrones oscilatorios espontáneos en el hipocampo y la corteza cerebral (Villete *et al.*, 2010; Balleza-Tapia *et al.*, 2010; Adaya-Villanueva *et al.*, 2010; Peña-Ortega *et al.*, 2012). Asimismo, en trabajos realizados en nuestro laboratorio (Alvarado-Martínez *et al.*, 2013) se ha mostrado que la proteína A β soluble afecta el procesamiento de la información olfativa al disminuir la capacidad de BOP para generar su actividad oscilatoria. Esta disminución pudiera ser la base patológica detrás de la hiposmia observada tanto en los pacientes con EA (Doty *et al.*, 1987; Morphy *et al.*, 1990), así como en los ratones con fenotipo EA (Wesson *et al.*, 2010b; Kawarabayashi *et al.*, 2011; Coronas-Sámano *et al.*, 2011).

3. JUSTIFICACIÓN

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un problema de salud pública que se agrava con el aumento en la expectativa de vida. La *Alzheimer's Disease International*, en su informe del año 2010, reportó que la prevalencia de la demencia (entre ellas la EA) en la población mundial era de un 5% a 7% a nivel mundial y de 7.3% para Latinoamérica. Esta cifra indica que 35.6 millones de personas alrededor del mundo padecía demencia en el 2010. Con base en estos datos, y en los que indican un incremento en la esperanza de vida, se estima que las enfermedades neurodegenerativas asociadas con la edad, como la EA, representarán un problema de salud pública importante.

Recientemente, se ha reportado que uno de los primeros síntomas de la EA

es un deterioro olfatorio, que ha motivado el estudio de los mecanismos celulares que lo subyacen. Si bien los mecanismos que desencadenan el inicio y el desarrollo de la EA son desconocidos, hay evidencia de que los oligómeros solubles de la A β son los responsables del deterioro cognoscitivo en etapas tempranas de la enfermedad y que este deterioro depende de la presencia de la proteína tau. Por otro lado, se conoce que los oligómeros de la A β son capaces de alterar la funcionalidad de las redes neuronales (p.e. las oscilaciones hipocampales) que son necesarias para los procesos de memoria y aprendizaje. Este mismo fenómeno se observa en el BOP (Alvarado-Martínez *et al.*, 2013; Wesson *et al.*, 2010b). Sin embargo, el mecanismo molecular a través del cual la proteína A β puede alterar la funcionalidad de la red neuronal del BOP no está bien descrito aún.

Existen evidencias de que la vía de señalización GSK3-tau (Fig. 3) está involucrada en el deterioro de la funcionalidad de otros circuitos neuronales y, por lo tanto, también pudiera ser este el caso en el BOP. Por ello, en este trabajo nos proponemos determinar de qué manera la proteína A β altera la funcionalidad del BOP y si la vía de señalización intracelular involucrada en este efecto incluye a la enzima GSK3 y a la proteína tau.

Señalización Beta amiloide-GSK3-Tau



Figura 3. Señalización activada por la Beta amiloide. Esquema representativo de la participación de la enzima GSK3 y la proteína tau en el deterioro neuronal inducido por la la proteína Beta amiloide (A β , modificado de Kremer *et al.*, 2011).

4. HIPÓTESIS

Si la cinasa GSK3 y la proteína tau participan en el efecto deletéreo de la proteína β amiloide sobre la actividad espontánea del BOP; entonces, la inhibición de la GSK3 y/o la disminución de la proteína tau evitarán el decremento de la actividad espontánea del BOP producido por la proteína β amiloide.

5. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar el efecto de la proteína β amiloide sobre la actividad espontánea del circuito neuronal del BOP así como la participación de la vía de señalización que involucra a la cinasa GSK3 y a la proteína tau en este efecto.

5.1 Objetivos específicos

1. Determinar, a través de experimentos farmacológicos, la participación de la GSK3 en el deterioro de la actividad espontánea del BOP por la aplicación de la A β .
2. Determinar, a través de experimentos farmacológicos y de regulación de la expresión génica, la participación de la proteína tau en el deterioro de la actividad espontánea del BOP por la aplicación de la A β .

6. SUJETOS, MATERIALES Y MÉTODOS

Para evaluar el efecto de la proteína A β sobre la actividad de la capa granular del BOP se emplearon ratones macho de la cepa CD-1 de 8 semanas de edad, que se obtuvieron del Bioterio del Instituto de Neurobiología de la UNAM. Los animales se mantuvieron en un ciclo luz/oscuridad de 12 horas, con alimentación *ad libitum*. Todas las manipulaciones experimentales se llevaron a cabo, siguiendo las regulaciones del Comité de Bioética del Instituto de Neurobiología.

6.1 Oligomerización de la A β

Con base a los resultados previos de nuestro laboratorio (Balleza-Tapia *et al.*, 2010; Adaya-Villanueva *et al.*, 2010), se ha determinado que la herramienta farmacológica de mayor potencia para evaluar los efectos de la A β sobre la actividad de los circuitos neuronales son los oligómeros solubles. Por ello, la oligomerización de la A β se realizó siguiendo el protocolo de Lambert *et al.*, (1998). De manera general, la A β ₁₋₄₂ sintético se incubó con 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP) a una concentración final de la proteína de 1 mM, por 60 min, a temperatura ambiente. La solución fue posteriormente evaporada para remover todo el HFIP durante un periodo de 18 hrs. Posteriormente, la proteína se resuspendió a una concentración 5 mM en DMSO al 100% para después diluirlo en medio F12 (con rojo fenol) a una concentración final de 100 μ M. Esta solución se incubó por 24 hrs a 4-5 °C y se centrifugó, en frío (4°C), a 14, 000 x g durante 10 min. El sobrenadante se depositó en alícuotas y se usó directamente en los experimentos.

6.2 Obtención de rebanadas de BOP

Para la obtención de las rebanadas de BOP, los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico vía intraperitoneal (40 mg/kg). Posteriormente, los animales fueron perfundidos transcardialmente con una solución “protectora” que contiene (en mM): 250 sacarosa, 3 KCl, 36 NaHCO₃, KH₂PO₄, 10 glucosa, 0.7 CaCl₂ y 2 MgSO₄. Esta solución se mantuvo fría (4°C) y burbujeada con gas carbógeno (95% O₂ y 5% CO₂) durante su uso. Al finalizar la perfusión, los ratones fueron sacrificados por decapitación y el cerebro se les extrajo y se disecó en frío. Los hemisferios fueron pegados a un bloque de agar con una inclinación de 30° y, con ayuda de un vibratomo, se obtuvieron rebanadas parasagitales de un grosor de 400 μ m. Las rebanadas de BOP se depositaron en una cámara con líquido cefalorraquídeo artificial (LCRA) para su recuperación a temperatura ambiente, durante una hora. El LCRA contiene (en mM): 119 NaCl, 30 glucosa, 25 NaHCO₃,

3 KCl, 1 MgCl₂ y 1.5 CaCl₂. El pH (7.4) y la oxigenación se mantuvo constante por gaseo con carbógeno.

6.3 Registro electrofisiológico de campo en la capa granular del BOP in vitro

Para el registro electrofisiológico de campo, las rebanadas fueron transferidas a una cámara de registro perfundida con LCRA, con oxigenación constante con carbógeno y mantenidas a 30-32 °C. Los registros electrofisiológicos se obtuvieron con electrodos de vidrio de borosilicato estirados por calentamiento con una resistencia de 0.5-1 MΩ rellenos de LCRA. Los electrodos fueron colocados sobre la rebanada en la capa granular con ayuda de un microscopio estereoscópico y un micromanipulador. Se registró por 20 minutos la condición control de la actividad espontánea poblacional, para posteriormente aplicar a la solución de perfusión distintos fármacos, cuyo efecto fue evaluado por 60 min (fármacos aplicados: Cloruro de Litio, 5 mM [Inhibidor no selectivo de la enzima GSK3 (Paula *et al.*, 2009)]; SB216736, 10 nM [Inhibidor selectivo de la enzima GSK3 (Facci *et al.*, 2003)]. A un grupo de animales se les administró ácido tolfenámico (50mg/Kg, tratamiento crónico por 21 días) por vía oral o intraperitoneal, con la finalidad de disminuir la expresión de la proteína tau (Adwan *et al.*, 2014). Otro grupo de animales fueron inyectados intrabulbalmente de forma bilateral con un ARN de interferencia de orquilla corta (shARN, 1µL) contra el transcrito de tau con la finalidad de disminuir la expresión de la proteína tau. De estos animales, también se obtuvieron rebanadas de BOP y se les registró exactamente de la misma manera descrita para los otros grupos experimentales. En todos los casos, se aplicó la proteína Aβ soluble (30 nM), al baño de registro, y se evaluó su efecto por 60 min. Finalmente, se aplicó lidocaína 1 mM durante 10 min, con la finalidad eliminar la actividad neuronal y evaluar la viabilidad de la rebanada. La señal electrofisiológica obtenida del registro fue amplificada, filtrada (1.5-1500 Hz), digitalizada (a 3 kHz) y almacenada en una computadora para su posterior análisis.

	TRATAMIENTO	
Registro de campo	Control (CTL)	<i>in vitro</i>
	Beta Amiloide (A β , 30 nM)	<i>in vitro</i>
	Cloruro de Litio (LiCl, 5 mM)	<i>in vitro</i>
	SB216763 (10 nM)	<i>in vitro</i>
	Ácido tolfenámico (TA, 50mg/Kg)	<i>in vivo</i>
	ARN de Interferencia (shARN, 1 μ L)	<i>in vivo</i>

Tabla 1. Resumen de los tratamientos. Se muestran los tratamientos *in vitro* (CTL, A β , LiCl y SB216763) e *in vivo* (TA y shARN) los cuales fueron aplicados antes (*in vivo*) o durante (*in vitro*) la obtención de los registros de campo de la actividad espontánea de la capa granular del bulbo olfatorio principal.

6.4 Pruebas Conductuales

Se realizaron dos pruebas conductuales de olfacción con la finalidad de observar cambios en la sensibilidad olfatoria de los animales tratados con ácido tolfenámico. La prueba de HABITUACIÓN-DESHABITUACIÓN (Yang y Crawley, 2009), la cual consiste en habituar durante 5 min a los ratones a una caja de ensayo limpia. Posteriormente, se realizó la prueba donde se colocaron 10 μ L de odorante en un papel filtro sobre la caja de la prueba. Tres estímulos (dos conteniendo olor) fueron utilizados en esta prueba: agua destilada, vinagre, y menta. El orden de presentación de los estímulos fue: agua, agua, vinagre, vinagre, vinagre, menta, menta, menta (donde el orden de los bloques de olor cambió aleatoriamente). Cada olor se presentó durante 2 min y se cuantificó el tiempo que el animal pasó olfateando cada olor. La habituación ocurrió si el tiempo que el ratón huele el aroma disminuyó con exposiciones repetidas al mismo olor. La discriminación ocurrió si el ratón olfateaba la primera presentación de vinagre o menta más tiempo de lo que había olido la última presentación del olor anterior (Wesson *et al.*, 2010; Yang y Crawley, 2009).

La segunda prueba realizada fue la prueba de evitación olfatoria. Para ello,

se utilizó 2,4,5-trimethylthiazol (TMT), un odorante volátil presente en las heces del zorro que produce una conducta innata de evitación en los roedores (Kim *et al.*, 2011; Lazarini *et al.*, 2014). La caja de prueba se dividió en tercios imaginarios y se cuantificó, fuera de línea, el tiempo que el animal estuvo en cada tercio y se calculó el índice de desempeño, como sigue:

$$\text{Índice de desempeño} = \frac{P-33}{0.33}$$

Donde **P** es el porcentaje de tiempo en el compartimento con TMT menos 33 (que corresponde al porcentaje de tiempo invertido en cada uno de los compartimentos en condiciones control) dividido entre 0.33 que equivalente al tercio correspondiente al TMT.

La prueba se realizó en 4 fases. En la primera, se colocó al ratón en una caja con las mismas dimensiones de la caja de la prueba (47x25.5x21 cm) sin aserrín durante 10 minutos, con el propósito de que se familiarizara al cuarto de la prueba y a la caja. La segunda fase consistió en colocar al animal en la caja de prueba con fines de habituación. En la tercera fase, se colocaron 2 papeles filtro (2x2 cm) en los dos compartimentos externos de la caja con 5 µl de agua destilada, esta fase duró 3 minutos. Se dio un intervalo de 5 minutos y se procedió con la cuarta fase de la prueba, en la que se colocaron 2 papeles filtro, 1 con agua destilada y el otro con 2,4,5-Trimethylthiazol (TMT) al 10% diluido en agua destilada (Kim *et al.*, 2011; Lazarini *et al.*, 2014).

6.5 Disminución de la expresión de la proteína tau con un ARN interferente

Para disminuir la expresión de la proteína tau en el BOP, éste se infectó con un vector lentiviral que contiene un shRNA para disminuir la expresión de la proteína tau (Tetsuya *et al.*, 2014). El lentivirus fue inyectado bilateralmente en la capa granular del BOP en ratones de 5 semanas. Después de 3 semanas de infección,

se obtuvieron rebanadas de BOP y se registró su actividad espontánea, en la capa granular, en condiciones control y durante la aplicación de A β .

Para las inyecciones del lentivirus se utilizó una cirugía estereotáxica. Para ello, los ratones adultos fueron anestesiados con una inyección intraperitoneal de xilacina (10mg/Kg); seguida de ketamina (80 mg/Kg; Imalgene; Merial). Se realizó una pequeña craneotomía en el sitio de la inyección con las siguientes coordenadas: 4.25 mm (anteroposterior) y 1.25 mm (mediolateral, ML) (Paxinos, 2004). La inyección del lentivirus se realizó a través de una micropipeta que se colocó en la capa granular del bulbo olfatorio, una profundidad dorsoventral de -2 mm, para la administración de 1 μ l de solución de lentivirus, por medio de un sistema de inyección por presión de aire.

6.6 RT-qPCR

6.6.1 Purificación del ARN

La purificación del ARN total del bulbo olfatorio se realizó de con el kit SV Total ARN Isolation System (Promega). El tejido se transfirió del amortiguador estabilizador ARN Later (*Ambion*) a un microtubo de 1.5 mL el cual contenía 175 μ L de solución de lisis (RLA, Tiocianato de guanidina en Tris pH 7.5 + 1 mL de β -mercaptoetanol). Este tejido se homogenizó y se agregaron 350 μ L de amortiguador de dilución (RDA) a la muestra, se mezcló por inversión y se centrifugó a 12 000 rpm durante 10 minutos. Posteriormente, el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se le añadieron 200 μ L de etanol al 100 % y se mezcló por inversión. La mezcla se colocó en una minicolumna de sílica (cromatografía líquida) contenida en un tubo de recolección y fue centrifugada a 12 000 rpm durante 60 segundos. El ARN contenido en la columna se recuperó con 600 μ L de solución de lavado (RWA, Acetato de potasio + Tris-HCl pH 7.5) y por centrifugación a 12 000 rpm por 60 segundos. Se descartó el eluido y se agregaron 50 μ L de una mezcla de incubación con DNAsa I (amortiguador amarillo (Tris pH 7.5, NaCl₂, colorante amarillo), MnCl₂ 0.09 M y DNAsa I). Después se inactivó la reacción agregando 200 μ L de solución de bloqueo de DNAsa (DSA,

Tiocianato de guanidina en Tris-HCl pH 7.5) y se centrifugó a 12 000 rpm por 60 segundos. Se realizaron dos lavados con solución de lavado (RWA), añadiendo 600 en el primero y 200 μ L en el segundo. La minicolumna fue centrifugada a 12 000 rpm durante 60 segundos y en una segunda ocasión dos minutos. En seguida, la minicolumna se transfirió a un tubo nuevo, se le adicionaron 20 μ L de agua con inhibidor de ribonucleasas y se incubó durante un minuto. Finalmente, la minicolumna fue centrifugada a 12, 000 rpm durante 2 minutos. La integridad del ARN total se analizó mediante la electroforesis en un gel de agarosa al 1%.

6.6.2 Síntesis de ADN complementario (ADNc)

La concentración y la pureza del ARN total se determinaron con un espectrofotómetro NanoDrop Thermo Scientific. El ADNc se sintetizó a partir de 1 μ g de ARN total. En un microtubo de 200 μ L se agregaron 1 μ g de ARN total, 8 μ L de amortiguador FS (first strand, 5x), 1 μ L de oligonucleótido antisentido 5 μ M (oligo dT), 1 μ l de *random primers*, 1 μ L de dNTPs 100mM y agua libre de ribonucleasas c.b.p. 39 μ L. La mezcla se homogenizó e incubó a 42 °C durante dos minutos. Luego, se añadió 1 μ L de la enzima M-MLV (*Promega*) y se incubó nuevamente a 42°C por 50 minutos.

Gen	Símbolo	Secuencia	No. Acceso Genbank	Tamaño del Amplicón
Superóxido dismutasa 2, mitocondrial	SOD2	Sentido (5') tggacaaacctgagccctaa (3') Antisentido (5') gacccaaagtcacgcttgata (3')	NM_017051.2	76pb
Tirosina 3-monooxygenasa/tryptophan, 5-monooxygenasa proteína de activación, zeta	Ywhaz	Sentido (5') ttgagcagaagacggaaggt (3') Antisentido (-)gaagcattggggatcaagaa (3')	BC094305	136 pb
Tau	Tau	Sentido (5') ggaggaggaataagaagattgt (3') Antisentido (5') gacactcatcgctagtgt (3')	NM_001038609.2	205 pb

Tabla 2. Oligonucleótidos usados en el qPCR.

6.6.3 PCR cuantitativa (qPCR)

La amplificación y cuantificación del ADNc de los transcritos de Tau, SOD2 y Ywhaz se llevó a cabo con el kit *LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I* (Roche). Brevemente, en cada capilar se añadieron 4 µL de H₂O libre de ribonucleasas, 1 µL de MgCl₂ 25 mM, 1 µL de la mezcla de oligonucleótidos sentido y antisentido del gen de interés (5 µM), 1 µL del *LightCycler® Fast-Start Reaction Mix SYBR Green I* (10x) y 3 µL de la dilución 1:5 del ADNc de cada sujeto experimental. Cada una de las reacciones se llevó a cabo por duplicado. Los genes constitutivos utilizados como control endógeno fueron la SOD2 y Ywhaz debido a que ambos presentan una secuencia genética altamente conservada entre especies, a que su expresión es necesaria para la supervivencia de las células (Zelko *et al.*, 2002; Nishimura *et al.*, 2013; Joo *et al.*, 2015) y a que sus niveles de expresión se mantienen constantes en tejido neuronal en ratas (Bonefeld *et al.*, 2008). La cuantificación del ARN mensajero se llevó a cabo en un termociclador siguiendo el protocolo experimental *LightCycler® 1.5 System* que consta de cuatro fases. Durante la primera fase, la temperatura del equipo se ajustó a 94 °C para realizar una desnaturalización inicial, en la cual se activa la enzima polimerasa que viene incluida en la mezcla de reacción del *LightCycler® Fast-Start Reaction Mix SYBR Green I*. En la segunda fase se llevó a cabo la amplificación del producto de PCR mediante una serie de ciclos repetidos (40 ciclos) de desnaturalización a 94 °C. Para el alineamiento de los oligonucleótidos específicos para cada gen se utilizaron 60 °C y para la elongación se utilizaron 72 °C. La tercera fase consiste en realizar una curva de desnaturalización (melting) del producto de PCR. En esta fase, la temperatura del equipo se elevó gradualmente lo suficiente para desnaturalizar el producto de PCR específico (en función de la longitud de la composición de bases del amplicón). Esta curva nos permitió identificar la presencia de un producto único de PCR o de productos inespecíficos. Finalmente, en la cuarta fase, la temperatura disminuyó hasta 40 °C para enfriar el equipo.

6.7 Análisis de datos

6.7.1 Registros de campo

Para analizar los registros poblacionales, utilizamos un análisis de potencia espectral mediante la Transformada Rápida de Fourier (TRF) (James *et al.*, 1999), con la ayuda del programa *pClamp* 9.3. Se aplicó la TRF a lo largo de los 150 min del registro con 3 ventanas de 10 segundos cada 10 minutos, para cada rebanada de BOP registrada. El espectro de potencia de cada grupo fue promediado y graficado para cada condición experimental. Se normalizaron los datos con respecto a la potencia control, que se consideró como 100%. De igual manera, se realizaron espectrogramas para cada una de las condiciones experimentales, tomando los últimos 5 min de registro en cada condición para su análisis. Para ello se utilizó el programa EEGLAB v13.5.4b en MATLAB, con la finalidad de mostrar el cambio en las distintas bandas de frecuencia de los registros. Se obtuvieron dos tipos de espectrogramas, el primero en una escala normal y el segundo en escala logarítmica esto se llevó a cabo con el objetivo de observar la magnitud del cambio en la potencia de los registros de campo.

6.7.2 Análisis del nivel del ARN mensajero mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$

La evaluación del nivel del ARN mensajero del gene de interés mediante la PCR cuantitativa en tiempo real se llevó a cabo por el método de cuantificación relativa descrito por Livak y Schmittgen (2001). Para ello se calcula el nivel de expresión como: cambio en el nivel = $2^{-\Delta\Delta Ct}$, donde $\Delta\Delta Ct = [CT_{\text{gen interés}} - CT_{\text{gen constitutivo (HK, por sus siglas en inglés) muestra interés}} - (CT_{\text{gen interés}} - CT_{\text{HK}})_{\text{control}}]$ (Livak y Schmittgen, 2001). Ahora bien, para cuantificar la magnitud del nivel del ARN mensajero del gen de Tau mediante el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$, realizamos una curva de calibración para cada gen utilizando diluciones seriadas de una mezcla de ADNc del bulbo olfatorio de los ratones control. Con las curvas de calibración se calculó la eficiencia de la reacción para cada gen. Las eficiencias de la reacción calculadas para los genes caseros y para el gen de interés fueron de 2. Finalmente, el valor promedio del CT obtenido de las reacciones por

duplicado de cada muestra de los individuos de cada grupo fue sustituido en la ecuación de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para determinar el nivel del ARN mensajero de cada gen.

6.7.3 Análisis estadístico

Se utilizaron los programas Prisma y Sigma Plot, para la elaboración de las gráficas y para la aplicación de las pruebas estadísticas descriptivas e inferenciales. Se utilizó como prueba estadística el análisis de la varianza (ANOVA) de una vía, de medidas repetidas, para la prueba de habituación-deshabitación (Fig 10). La prueba estadística Kruskal-Wallis se utilizó para los resultados del qPCR y se utilizó la prueba de Friedman para la cuantificación de los cambios en la potencia de la actividad de campo (Fig 4-9). Al encontrar una diferencia significativa, se procedió a realizar las correspondientes pruebas *post hoc* de comparaciones múltiples de Tukey o Dunn, según fuera el caso. Para el análisis entre dos grupos experimentales distintos se utilizaron pruebas *t de student* para la prueba de deshabitación (Fig 10) y Wilcoxon para el resto de los resultados (Fig 4-9). Se consideró como una diferencia significativa aquella con un valor de $p < 0.05$. En todos los casos se muestra la media \pm error estándar del porcentaje cambio de la potencia del registro de campo con respecto del control.

7. RESULTADOS

7.1 LA CAPA GRANULAR DEL BOP GENERA ACTIVIDAD ESPONTÁNEA QUE SE MANTIENE ESTABLE A LO LARGO DEL TIEMPO (90 MINUTOS)

Con la finalidad de caracterizar la estabilidad de la actividad espontánea en las rebanadas del bulbo olfatorio, se evaluó la actividad oscilatoria espontánea de la capa granular, por 90 minutos continuos, ($n = 6$ rebanadas de BOP obtenidas en ratones de 8 semanas de edad). Con fines de comparación, se tomaron 3 muestras del registro en ventanas de 1 min, cada 10 min, a lo largo del experimento. De esta manera, la actividad eléctrica espontánea del BOP, no presentó cambios apreciables a lo largo del tiempo de registro, como lo muestran los trazos representativos y el espectro de potencia de dichos trazos (Fig 4A-C). Los componentes de frecuencia de esta actividad, que presenta su mayor potencia en un rango entre 4-12 Hz, se mantienen a lo largo de este tiempo (Fig. 4C). La potencia de la actividad correspondiente a los 80 min de registro continuo fue de 131.40 ± 29.85 % del control, lo que no es significativamente distinto a la potencia presentada a los 20 min del registro control, indicando que la actividad de la rebanada es estable a lo largo del tiempo (Fig. 4D, tabla 3). Posteriormente se aplicó lidocaína ($1 \mu\text{M}$), este tratamiento redujo significativamente la actividad espontánea a un 49.27 ± 17.93 % del control (Fig. 4C y D, ver tabla 2, $*p < 0.05$, Friedman, *post hoc* comparación múltiple de Dunn).

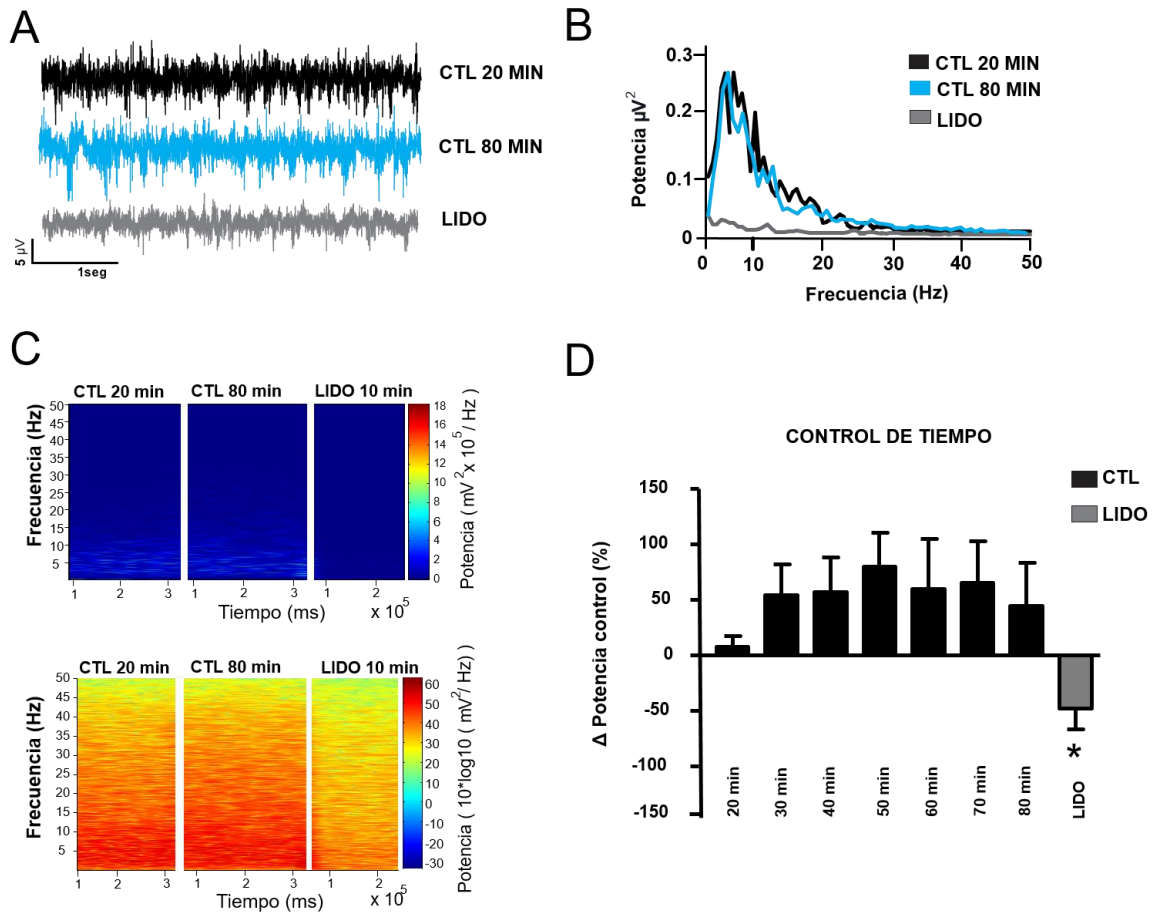


Fig 4. LA ACTIVIDAD ESPONTÁNEA DE LA CAPA GRANULAR DEL BOP SE MANTIENE ESTABLE A TRAVÉS DEL TIEMPO DE REGISTRO. **A)** Trazos representativos de la actividad espontánea de la capa granular del BOP en condición control 20 min (trazo negro), a los 80 min (trazo azul) y durante la aplicación de Lidocaína (trazo gris). **B)** Espectros de potencia de los registros correspondientes a los 20 (negro) y 80 (azul) min en condiciones control y posterior a la aplicación de lidocaína (gris). **C)** Espectrogramas de la actividad espontánea de la capa granular del BOP en condición control (CTL) a los 20 y 80 minutos de registro en las mismas condiciones. Se muestran también los espectrogramas de la actividad posterior a la aplicación de lidocaína (LIDO) La potencia de los espectrogramas superiores se muestra en escala normal, mientras que en los inferiores se muestra en escala logarítmica, en ambos casos la escala de color indica mayor potencia en colores cálidos y menor potencia en colores fríos. **D)** Porcentaje de cambio de la potencia de 1 a 60 Hz. Se puede observar que no hay cambio en la actividad espontánea durante 80 minutos de registro continuo en condiciones control. También se observa la disminución de la potencia provocada después de la aplicación de lidocaína 1 μ M, lo que confirma la viabilidad de las rebanadas utilizadas. (*) denota una diferencia significativa con respecto del control ($p < 0.05$, Friedman, *post hoc* comparación múltiple de Dunn).

7.2 EFECTO DE LA APLICACIÓN DE LA PROTEÍNA A β SOBRE LA ACTIVIDAD ESPONTÁNEA DE LA CAPA GRANULAR DEL BOP.

Para evaluar el efecto de la proteína A β sobre la actividad del circuito de la capa granular del BOP, se aplicó esta proteína a una concentración de 30 nM en el baño de registro a 5 rebanadas de BOP de ratones de 8 semanas de edad. La aplicación de la A β induce una disminución en la potencia de la actividad espontánea de la capa granular del BOP, misma que se refleja como una disminución proporcional en una banda de frecuencia de entre los 3-12 Hz (Fig. 5B-C). Este decremento generalizado en la potencia de la actividad espontánea de la capa granular del BOP reduce a 50.62 ± 8.51 % respecto del control (Fig. 5D, tabla 3, * $p < 0.0008$, prueba de Friedman, *post hoc* comparación múltiple de Dunn).

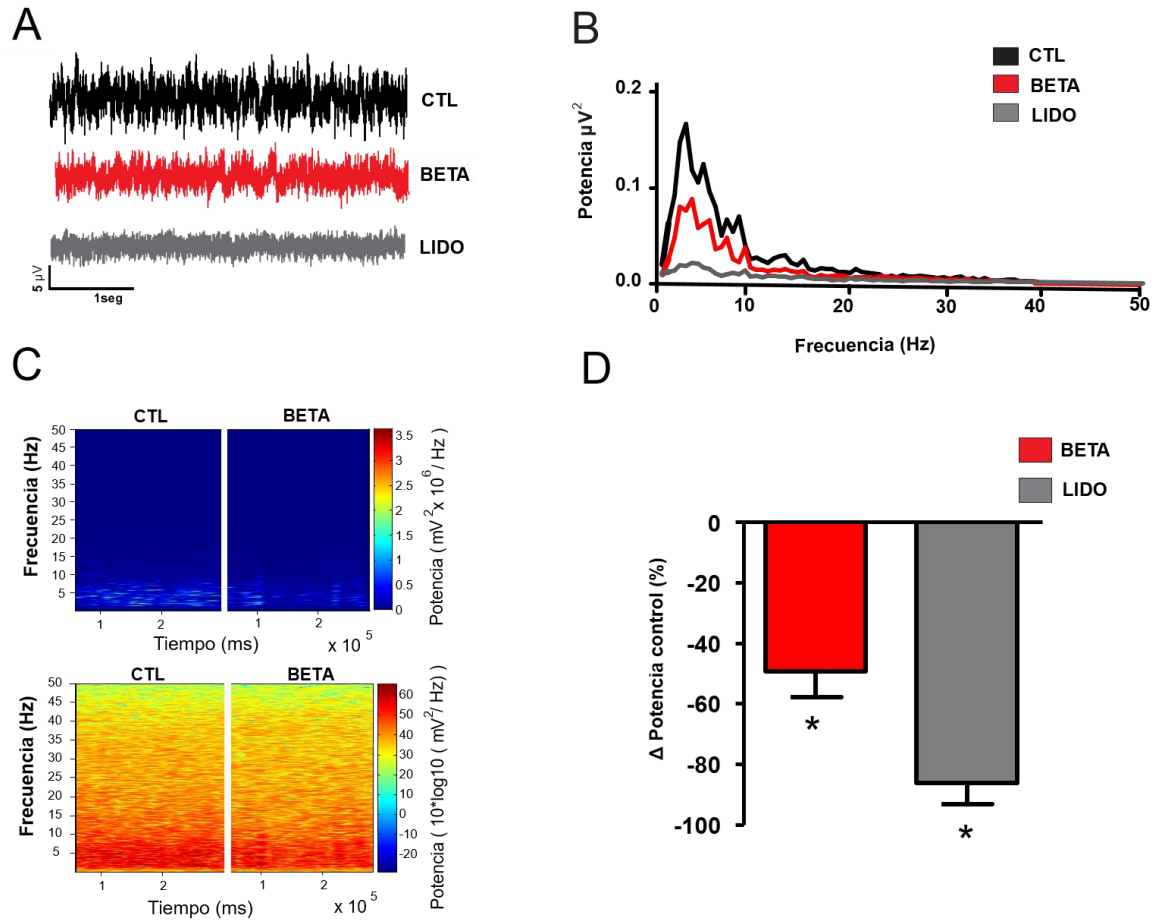


Fig 5. LA A β DISMINUYE LA ACTIVIDAD ESPONTÁNEA DE LA CAPA GRANULAR DEL BOP. **A)** Trazos representativos de la actividad espontánea de la capa granular del BOP en condición control (trazo en negro), en presencia de la A β (trazo en rojo) y durante la aplicación de lidocaína (trazo en gris). **B)** Espectros de potencia correspondientes a las condiciones experimentales representadas en A. **C)** Espectrogramas de la actividad espontánea de la capa granular del BOP en condición control (CTL) y en presencia de A β . La potencia de los espectrogramas superiores se muestra en escala normal, mientras que en los inferiores se muestra en escala logarítmica **D)** Porcentaje de cambio de la potencia de 1 a 60 Hz. Se puede observar la disminución de la actividad espontánea de la capa granular en el BOP después de 60 min de la aplicación de la A β (30 nM, barra roja), así como después de la subsecuente aplicación de Lidocaína (1 μ M, barra gris). La línea punteada denota los niveles de potencia control. (*) denota una diferencia significativa con respecto al control (* $p < 0.0008$, prueba de Friedman, *post hoc* comparación múltiple de Dunn).

7.3 EFECTO DEL CLORURO DEL LITIO (LiCl, INHIBIDOR INESPECÍFICO DE LA GSK3) SOBRE EL DAÑO INDUCIDO POR LA PROTEÍNA A β EN LA ACTIVIDAD ESPONTÁNEA DE LA CAPA GRANULAR DEL BOP

Para identificar la participación de la enzima GSK3 en el deterioro inducido por la proteína A β en el circuito del BOP, se aplicó LiCl (5 mM) en el baño de registro de campo, después de 20 min de registro de la actividad espontánea control, en 6 rebanadas de ratones de 8 semanas de edad. Los resultados muestran que la actividad eléctrica espontánea del BOP después de la aplicación de LiCl (60 min) no se modifica, presentando un promedio de 95.98 ± 21.95 % en comparación del control (Fig 6A-C, tabla 2, $p > 0.05$, test de Friedman, *post hoc* comparación múltiple de Dunn). Estos resultados muestran que la potencia de la actividad espontánea durante las condiciones control y la aplicación de LiCl no cambia significativamente dentro de una banda de frecuencia entre 4-20 Hz (Fig 6B). Asimismo, la Fig 6B y C muestran que la aplicación de la A β (30 nM) en presencia de LiCl, no modifica significativamente la actividad del BOP con respecto al control (tabla 2, $p > 0.05$, prueba de Friedman, *post hoc* comparación múltiple de Dunn).

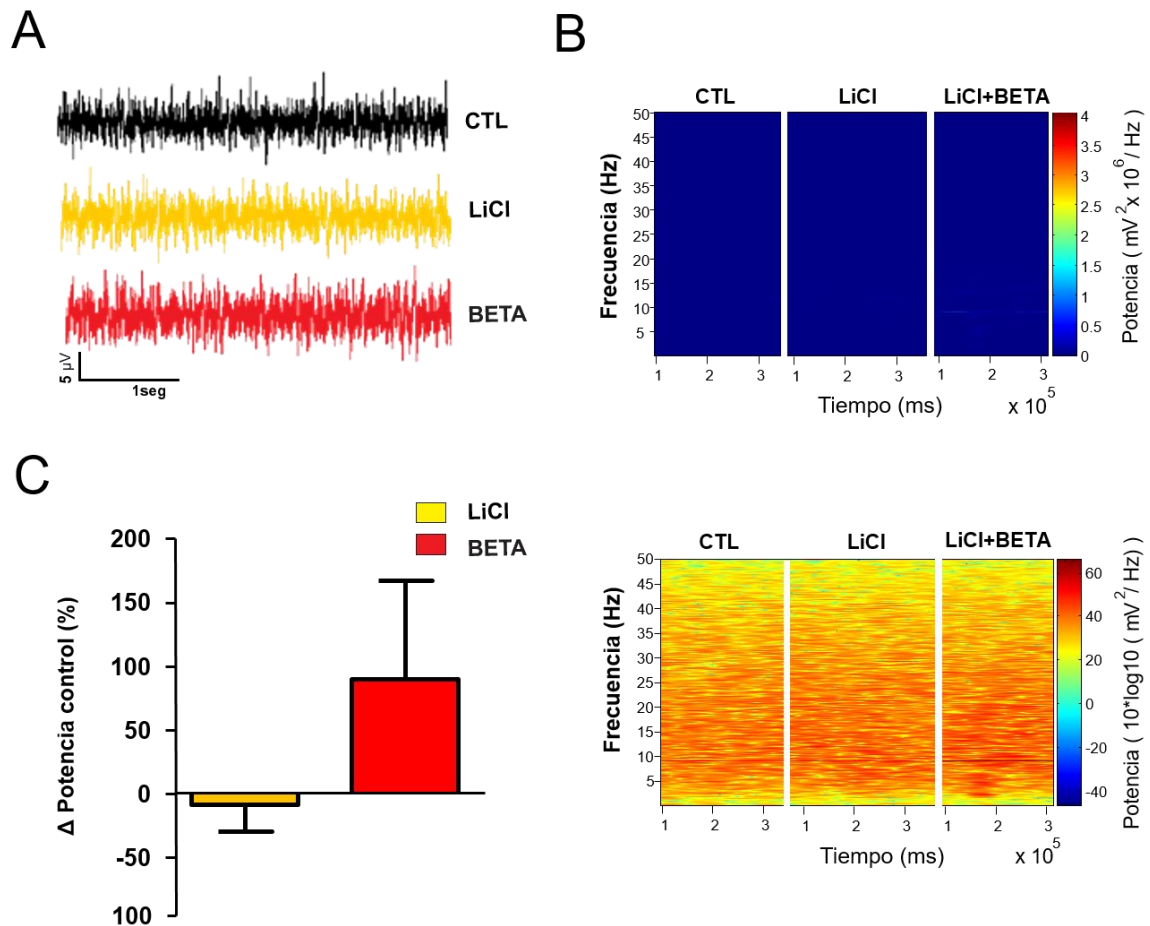


Fig 6. EFECTO DE LA APLICACIÓN AGUDA DE CLORURO DE LITIO (LiCl, INHIBIDOR NO SELECTIVO DE LA GSK3) SOBRE EL DAÑO INDUCIDO POR A β EN LA ACTIVIDAD ESPONTÁNEA DE LA CAPA GRANULAR DEL BOP. A) Trazos representativos de la actividad espontánea de la capa granular del BOP en condición control (trazo negro), durante la aplicación de LiCl (trazo amarillo) y en presencia de LiCl + A β (trazo rojo). **B)** Espectrogramas de la actividad espontánea de la capa granular del BOP en condición control (CTL), durante la aplicación de LiCl y en presencia de LiCl + A β . La potencia de los espectrogramas superiores se muestra en escala normal, mientras que en los inferiores se muestra en escala logarítmica. **C)** Porcentaje de cambio de la potencia de 1 a 60 Hz. Se puede observar la actividad espontánea de la capa granular en el BOP durante la aplicación de LiCl (5 mM, barra amarilla) después de 60 min. Posteriormente en presencia de LiCl se adicionó la aplicación de la A β (30 nM, barra roja) después de 60 min de registro. La línea punteada denota los niveles de potencia control. n=6 ($p > 0.05$, prueba de Friedman, *post hoc* comparación múltiple de Dunn).

7.4 EFECTO DE LA APLICACIÓN DEL SB216763, (INHIBIDOR SELECTIVO DE LA GSK3) SOBRE LA ACTIVIDAD ESPONTÁNEA DE LA CAPA GRANULAR DEL BOP EN PRESENCIA DE LA PROTEÍNA A β

Con la finalidad de corroborar la especificidad el efecto protector de la inhibición de la enzima GSK3 ante el daño inducido al circuito del BOP por la A β , utilizamos un inhibidor selectivo para esta enzima, el SB216763 (10 nM, 60 min), en 6 rebanadas de ratones de 8 semanas de edad. Con la aplicación del inhibidor específico de la GSK3, la potencia de la actividad espontánea de la capa granular del BOP en una banda de frecuencia entre 4-12 Hz, no se modificó significativamente (Fig 7A-C) del registro control (ver tabla 2, $p > 0.5$, prueba de Friedman, *post hoc* comparación múltiple de Dunn). Posteriormente, con la adición de la A β (30 nM), en presencia de SB216763, se observó un aumento de la potencia de la actividad espontánea del BOP, la cual no es significativamente distinta a la potencia de la actividad espontánea del control (Fig 7C, tabla 2, $p > 0.5$, prueba de Friedman, *post hoc* comparación múltiple de Dunn). Lo anterior, corrobora la participación de la enzima GSK3 en la disminución de la potencia de la actividad espontánea del BOP producido por la A β (Fig 5A-D).

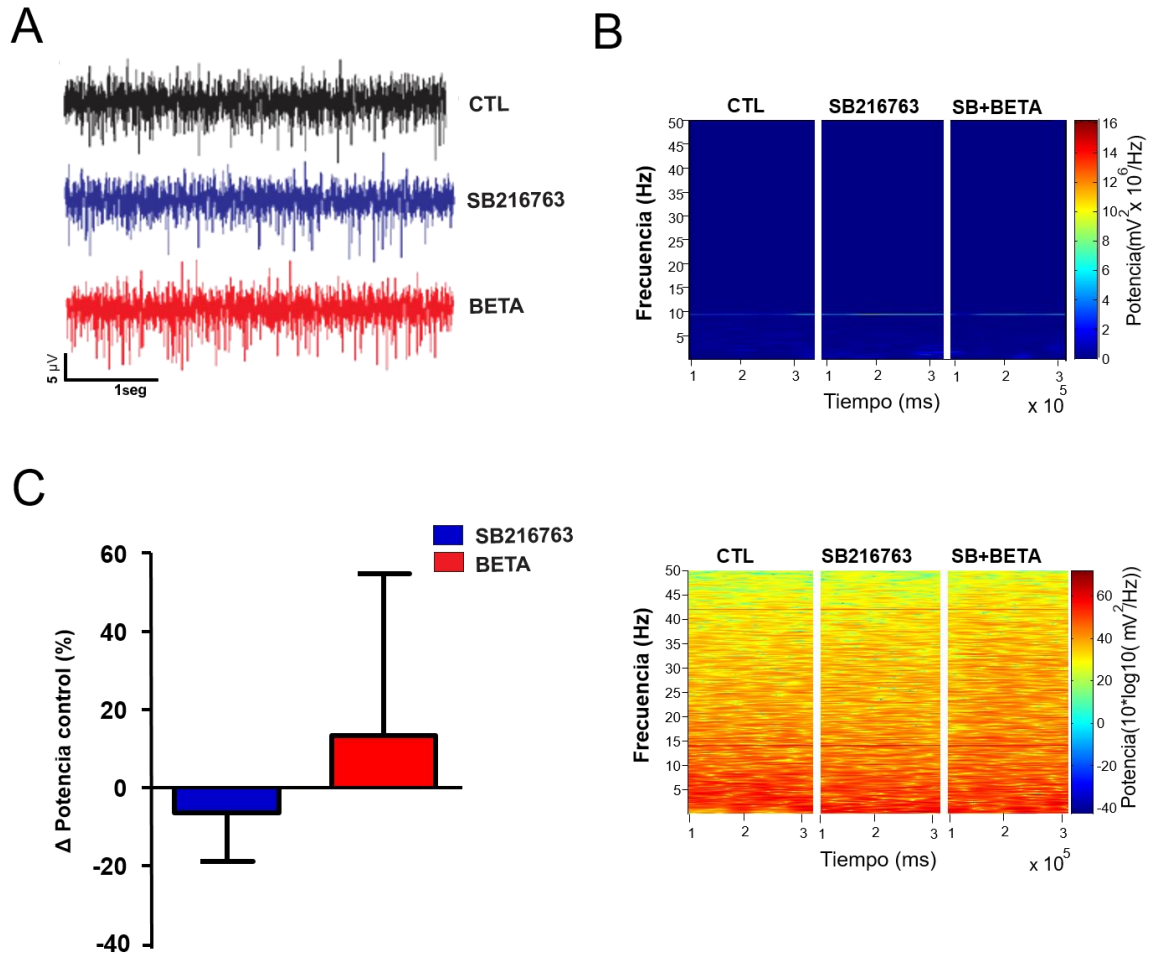


Fig 7. EFECTO DE LA APLICACIÓN DE SB216763 (INHIBIDOR SELECTIVO DE GSK3) SOBRE EL DAÑO INDUCIDO POR LA A β EN LA ACTIVIDAD ESPONTÁNEA DE LA CAPA GRANULAR DEL BOP. A) Trazos representativos de la actividad espontánea de la capa granular del BOP en condición control (trazo negro), durante la aplicación de SB216763 (trazo azul) y en presencia SB216763 + A β (trazo rojo). **B)** Espectrogramas de la actividad espontánea de la capa granular del BOP en condición control (CTL), durante la aplicación de SB236763 y en presencia de SB216763 + A β . La potencia de los espectrogramas superiores se muestra en escala normal, mientras que en los inferiores se muestra en escala logarítmica. **C)** Porcentaje de cambio de la potencia de 1 a 60 Hz. Se puede observar que no se presenta cambio en la actividad espontánea de la capa granular en el BOP durante la aplicación de SB216763 (5 mM, barra azul) después de 60 min. Posteriormente, la aplicación de la A β (30 nM, barra roja) en presencia de SB216763, después de 60 min más de registro. La línea punteada denota los niveles de potencia control. n = 6 (p > 0.5, prueba de Friedman, *post hoc* comparación múltiple de Dunn).

7.5 EFECTO DEL TRATAMIENTO CON ÁCIDO TOLFENÁMICO SOBRE LA ACTIVIDAD ESPONTÁNEA DE LA CAPA GRANULAR DEL BOP EN PRESENCIA DE LA PROTEÍNA A β

Con la finalidad de identificar la participación de la proteína tau en el daño inducido al circuito del BOP por la A β , utilizamos ácido tolfenámico (TA) 50 mg/Kg vía i.p. y oral, al no existir diferencias significativas en la potencia de la actividad espontánea de campo entre las dos vías de administración del TA (dato no mostrado), se combinaron los datos como un solo grupo (n = 12 de ratones de 8 semanas de edad). Este fármaco induce la degradación de la proteína SP1 (Abdelrahim *et al.*, 2006), lo que a su vez disminuye la expresión de la proteína tau (Heicklen-Klein *et al.*, 2000). La aplicación de la A β (30 nM) en rebanadas obtenidas de animales tratados con TA no produce ningún cambio significativo con respecto del control, en un rango de frecuencia entre 4-35 Hz de la potencia en la actividad espontánea del BOP (Fig 8A-C, tabla 2 p > 0.5, (p > 0.5, prueba de Friedman, *post hoc* comparación múltiple de Dunn). Sin embargo, al cuantificar la expresión del ARNm de tau podemos apreciar que no existe diferencia significativa en los niveles de expresión en el ARNm por el tratamiento con TA con respecto al grupo control (Fig 8, p > 0.5, prueba de Kruskal-Wallis, *post hoc* comparación múltiple de Dunn). Lo anterior indica que el tratamiento con TA presenta un efecto protector contra el deterioro de la potencia de la actividad espontánea del BOP inducida por la A β (Fig 5A-D), sin embargo, este efecto no depende de cambios en la expresión del ARNm de la proteína tau en el BOP.

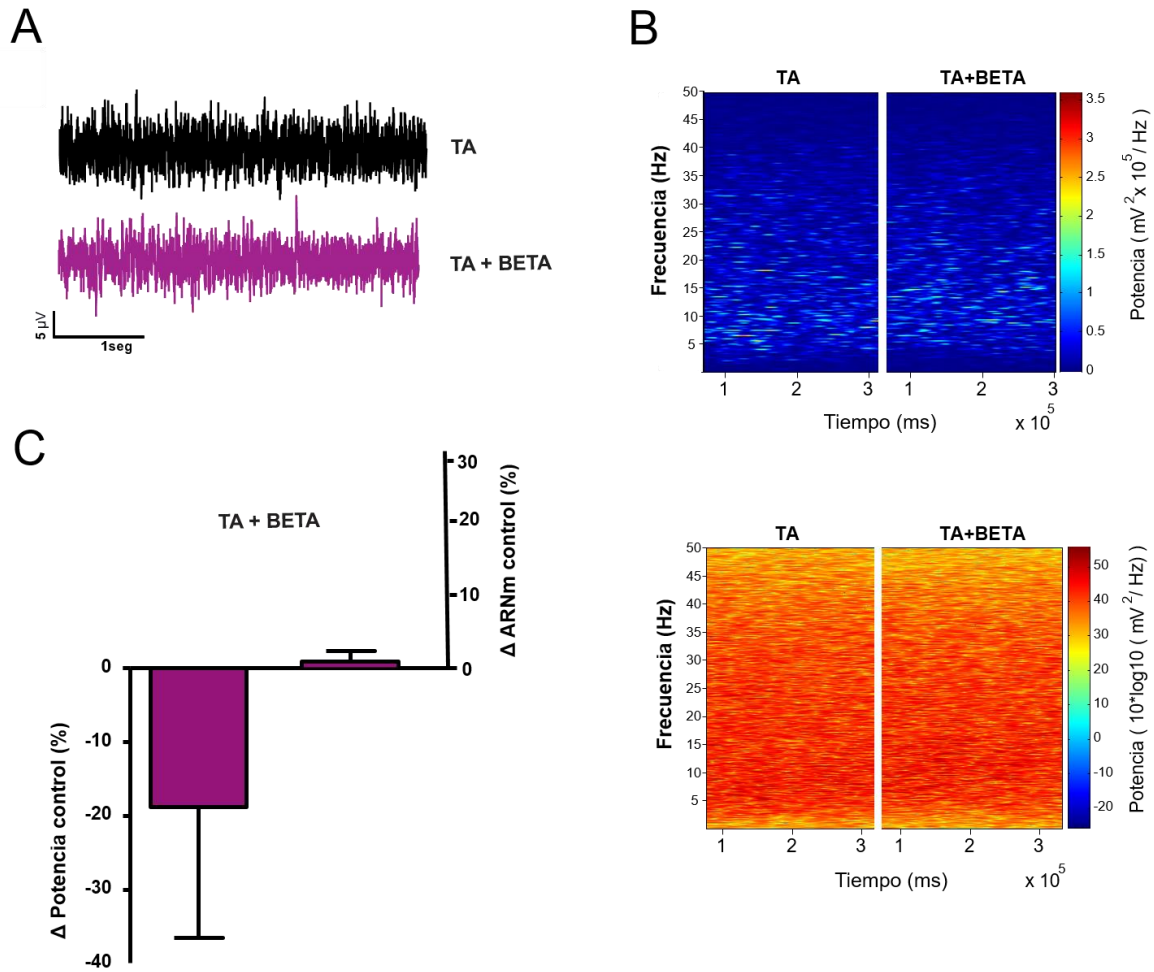


Fig 8. EFECTO DE LA APLICACIÓN DE ÁCIDO TOLFENÁMICO SOBRE EL DAÑO INDUCIDO POR LA A β EN LA ACTIVIDAD ESPONTÁNEA DE LA CAPA GRANULAR DEL BOP. **A)** Trazos representativos de la actividad espontánea de la capa granular del BOP en condiciones control (trazo negro) y después de la aplicación de la A β (trazo morado). **B)** Espectrogramas de la actividad espontánea de la capa granular del BOP en condición control (TA) y en presencia de A β . La potencia de los espectrogramas superiores se muestra en escala normal, mientras que en los inferiores se muestra en escala logarítmica. **C)** (Izquierda) Porcentaje de cambio de la potencia de 1 a 60 Hz, ($n = 12$, ($p > 0.5$, prueba de Friedman, *post hoc* comparación múltiple de Dunn). (Derecha) Porcentaje de cambio en la expresión génica del ARNm de la proteína tau. ($p > 0.05$, prueba de Kruskal-Wallis, *post hoc* comparación múltiple de Dunn).

7.6 EFECTO DE LA INYECCIÓN INTRABULBAR DE UN shARN PARA EL TRANSCRITO DE LA PROTEINA TAU SOBRE LA ACTIVIDAD ESPONTÁNEA DE LA CAPA GRANULAR DEL BOP EN PRESENCIA DE LA PROTEÍNA A β

Con la finalidad de identificar la participación de la proteína tau en el daño inducido al circuito del BOP por la A β , se inyectó en el bulbo olfatorio un shARN contra el transcrito de tau. Se puede apreciar que la aplicación de la A β (30 nM) en rebanadas obtenidas de animales inyectados con shARN de tau induce un decremento significativo en la potencia de la actividad espontánea del BOP de 49.15 ± 8.54 % respecto del control en el rango de frecuencias 5-35 Hz, (Fig 9A-C, $p < 0.0001$, prueba de Friedman, *post hoc* comparación múltiple de Dunn, tabla 3). Cuando realizamos la cuantificación de los niveles de expresión del ARNm de tau, el resultado muestra una reducción significativa a un 37.16 ± 0.97 con respecto del control (Fig 9C, $p < 0.0001$, prueba de Kruskal-Wallis, *post hoc* comparación múltiple de Dunn). Este hecho indica que la inyección del shARN de tau reduce significativamente la cantidad de ARNm de tau, lo cual podría parte del efecto deletéreo de la actividad espontánea del BOP en presencia de la A β (comparar con Fig 5A-D). Sin embargo, cabe señalar que el procedimiento de perfusión realizado en el grupo control para el análisis de qPCR, también redujo significativamente los niveles de expresión de ARNm de la proteína tau, (Fig 9D, $p < 0.0001$, prueba de Kruskal-Wallis, *post hoc* comparación múltiple de Dunn), lo que deja abierta la posibilidad de la participación de esta proteína en el efecto deletéreo inducido por la A β en el BOP.

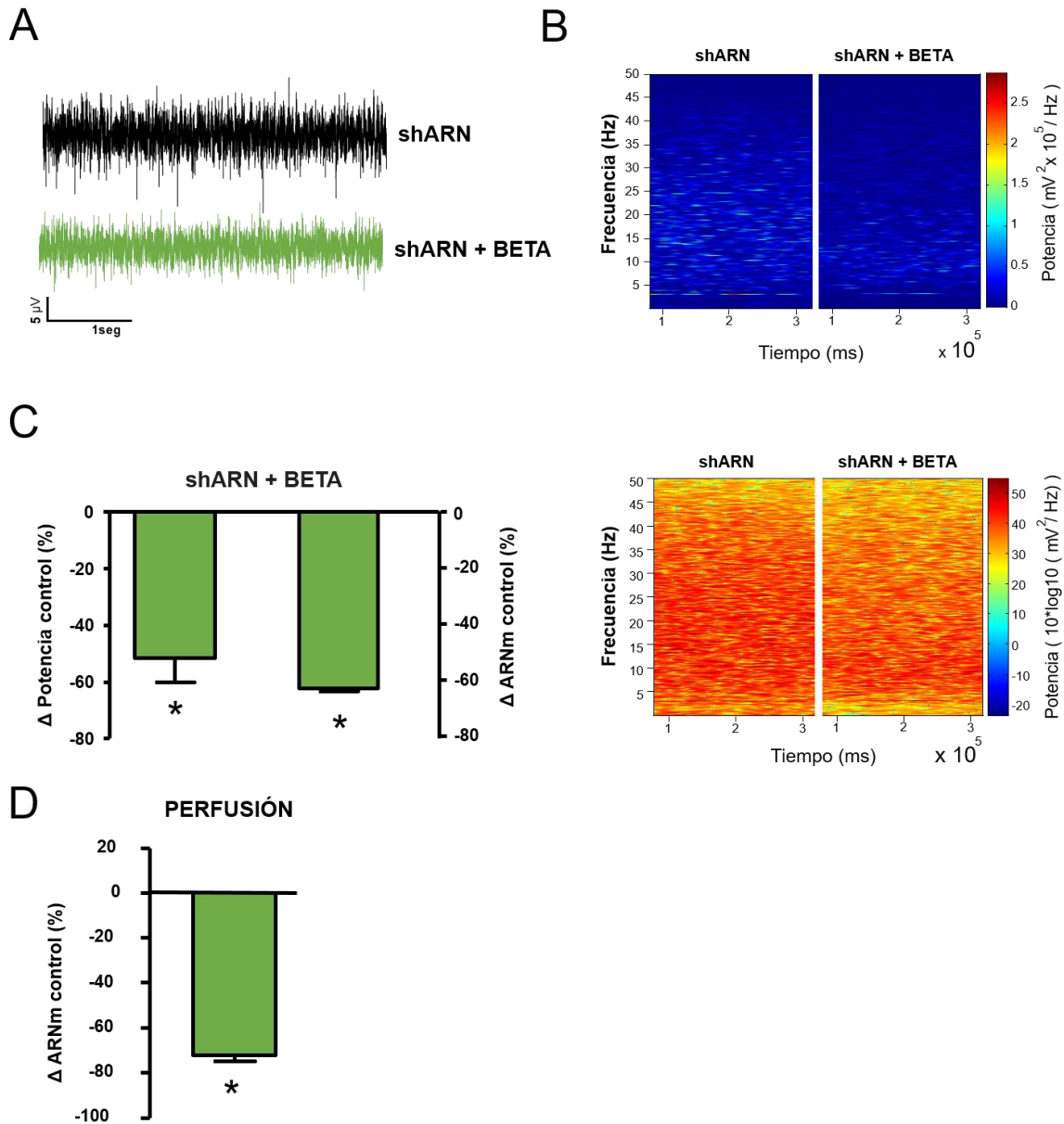


Fig 9 EFECTO DE LA INYECCIÓN INTRABULBAR DEL shARN CONTRA EL TRANSCRITO DE TAU SOBRE LA ACTIVIDAD ESPONTÁNEA DE LA CAPA GRANULAR DEL BOP EN PRESENCIA DE LA PROTEÍNA A β . **A)** Trazos representativos de la actividad espontánea de la capa granular del BOP en condiciones control (shARN, trazo negro) y después de la aplicación de la A β (trazo verde). **B)** Espectrogramas de la actividad espontánea de la capa granular del BOP en condición control (shARN) y en presencia de A β . La potencia de los espectrogramas superiores se muestra en escala normal, mientras que en los inferiores se muestra en escala logarítmica. **C)** (Izquierda) Porcentaje de cambio de la potencia de 1 a 60 Hz (n = 6, *p < 0.0001, prueba Friedman, *post hoc* comparación múltiple de Dunn). (Derecha) Porcentaje de cambio en la expresión génica del ARNm a través de la inyección de un shARNm de la proteína tau (p <

0.05, prueba de Kruskal-Wallis, *post hoc* comparación múltiple de Dunn). **D)** Porcentaje de cambio en la expresión génica del ARNm de la proteína tau provocada por la perfusión del animal antes de la obtención de la rebanada (*p < 0.0001, prueba de Kruskal-Wallis, *post hoc* comparación múltiple de Dunn).

Grupo	60 min	120 min
Control	131.40 ± 29.85	ND
β-Amiiloide	50.62 ± 8.51*	ND
LiCl	95.98 ± 21.95	186.00 ± 90.36
SB216763	93.55 ± 12.54	113.40 ± 41.29
TA	81.32 ± 17.70	ND
shARN vs tau	49.15 ± 8.54*	ND

Tabla 3. Resumen del porcentaje de cambio en la potencia de la actividad espontánea del Bulbo olfatorio. Se muestran el porcentaje de cambio en la potencia de la actividad espontánea del bulbo olfatorio con respecto del control a los 60 y 120 min después de la aplicación de los diferentes fármacos. Los resultados en negritas indican diferencia significativa con respecto del control (p < 0.05, prueba de Friedman, *post hoc* comparación múltiple de Dunn). (Cloruro de Litio, LiCl; inhibidor selectivo de GSK3, SB216763; rebanadas de animales tratados con ácido tolfenámico (TA) y rebanadas de animales inyectados intrabulbarmente con un shARN contra el transcrito de la proteína tau, shARN, No Determinado, ND).

7.7 EFECTO DEL TRATAMIENTO CON LA PROTEÍNA Aβ, EL ÁCIDO TOLFENÁMICO Y EL shARN DE TAU SOBRE LA OLFACCIÓN

Paralelamente, se realizó una serie de evaluaciones conductuales sobre la olfacción: (a) habituación-deshabitación y b) la prueba de evitación olfatoria. Esto permitió analizar de una manera más integral el impacto de la proteína Aβ, del tratamiento con ácido tolfenámico o con el shARN sobre la percepción olfativa. A continuación, describiremos la prueba de habituación-deshabitación la cual dividimos en dos fases, primero se describirá la fase de habituación (disminución de tiempo de exploración ante la presentación repetida de un mismo estímulo). En este sentido, podemos apreciar que el grupo control presenta una disminución significativa en el tiempo de olfateo ante la repetición en la presentación del primer estímulo (agua) disminuyendo hasta un 34.90 % en el tiempo de olfacción

invertido en la exploración del estímulo inerte (Fig 10A, $p < 0.0002$, prueba t de student), lo cual es considerado signo de habituación.

Para la presentación del vinagre, el tiempo de olfateo entre la primera y la tercera vez en la presentación del aroma, disminuyó significativamente hasta un 14.98 % del tiempo invertido en la olfacción ($p < 0.0001$, ANOVA de medidas repetidas, *post hoc* comparación múltiple de Tukey) indicando habituación también para este aroma. Asimismo, para la presentación repetida de menta el tiempo de olfateo en la tercera exposición se redujo hasta un 8.97 % del tiempo de exploración del mismo aroma por primera vez ($p < 0.0001$, ANOVA de medidas repetidas, *post hoc* comparación múltiple de Tukey). Este mismo fenómeno en la disminución en el tiempo de olfateo ante la presentación repetida de un mismo estímulo se observó para los animales tratados con TA vía i.p. (TAip), oral (TAoral), o que fueron microinyectados con el lentivirus que contiene el shARN contra el transcrito de tau (Fig 10A, $p < 0.0001$, ANOVA de medidas repetidas, *post hoc* comparación múltiple de Tukey). Sin embargo, es muy importante señalar que el grupo microinyectado con beta amiloide no presentó el fenómeno de habituación en ninguno de los estímulos, es decir; no existe una disminución significativa en el tiempo de olfacción ante la repetición del mismo estímulo. Este fenómeno se observó tanto para el estímulo inerte (agua), como para la presentación de los dos aromas (menta y vinagre, Fig 10A, $p > 0.05$, ANOVA de medidas repetidas, *post hoc* comparación múltiple de Tukey).

La segunda fase de la prueba de habituación-deshabitación es la deshabitación (discriminación, aumento en el tiempo de olfateo entre dos aromas distintos). En la prueba de deshabitación el grupo control presenta un tiempo de olfateo de 2.65 ± 0.49 s; en la última exploración del primer estímulo (agua), cuando se presenta de manera consecutiva el aroma nuevo (vinagre), el tiempo de olfateo aumenta significativamente a 9.58 ± 0.57 s, con respecto a la exposición anterior ($p < 0.0001$, prueba t-student), por lo que esta diferencia se considera signo de deshabitación olfatoria (discriminación). De manera similar el cambio de presentación de aroma entre la presentación del aroma vinagre y el aroma menta,

presentó un aumento significativo en el tiempo de olfacción, pasando de 1.43 ± 0.33 s en la exploración del aroma a vinagre, a un 10.16 ± 0.59 s para la exploración del aroma menta (signo de deshabitación olfatoria). En contraste, el grupo tratado intrabulbarmente con proteína beta amiloide, presentó una reducción significativa en el tiempo de olfateo ante el agua (3.77 ± 0.60 s) y a la presentación de los 2 aromas (vinagre y menta, 2.60 ± 0.25 s 1.78 ± 0.22 s respectivamente) con respecto del control (* $p < 0.0004$, ANOVA, *post hoc* comparación múltiple de Tukey), este hecho podría indicar un deterioro en la olfacción. En cuanto a la deshabitación, el tiempo de olfateo no es significativamente distinto ante el cambio en la presentación de los distintos estímulos ($p > 0.05$, prueba de Friedman), lo cual indica que el fenómeno de deshabitación (discriminación) no se presenta en estos animales (Fig 10A). Para el grupo tratado con TAip, el fenómeno de deshabitación se presentó de igual forma que en el grupo control, ya que los tiempos de olfateo ante el cambio de estímulo fueron significativamente distintos: agua-vinagre, de 3.8 ± 0.35 s a 7.31 ± 0.79 s; y de vinagre a menta, de 0.32 ± 0.17 s a 4.39 ± 0.42 s, respectivamente (* $p < 0.002$, prueba t-student; signo de deshabitación olfatoria). Es importante señalar que el grupo TAip disminuyó significativamente el tiempo de olfateo en la presentación del tercer aroma con respecto al grupo control (* $p < 0.0004$, ANOVA, *post hoc* comparación múltiple de Tukey). Sin embargo, estos animales pueden discriminar el cambio en la presentación de nuevos aromas (Fig 10A). Asimismo, el grupo de animales tratados con TAoral, puede discriminar entre estímulos mostrando aumento en los tiempos de olfateo ante el cambio del aroma al igual que el grupo control. De esta forma se observa que el aumento en el tiempo de olfateo entre agua-vinagre, pasó de 0.58 ± 0.52 s a 5.82 ± 0.52 s respectivamente. Del mismo modo al cambiar el estímulo entre vinagre-menta, el tiempo de olfateo aumentó de 0.59 ± 0.19 s a 5.97 ± 0.27 s, respectivamente, este incremento en los tiempos de olfateo entre estímulos son significativamente distintos (* $p < 0.03$, prueba t-student) y son signo de deshabitación olfatoria. Por último, el grupo inyectado con el shARN de tau presenta el mismo patrón de deshabitación (discriminación), mostrando un

aumento significativo en tiempo de olfacción entre agua-vinagre y entre vinagre-menta ($p < 0.03$, prueba t-studen).

La segunda prueba de olfacción que realizamos, fue la prueba de evitación olfatoria (Kim *et al.*, 2011, Lazarini *et al.*, 2014). En la cuantificación del índice de desempeño (ver materiales y métodos) los valores más negativos indican un menor tiempo de permanencia en el tercio de la caja donde se encontraba el olor aversivo (TMT). El grupo control obtuvo un índice de -50.56 ± 8.90 , lo que indica que estos animales pasaron más tiempo en los compartimentos donde no había TMT, mientras que los grupos TAi.p. y TAoral, obtuvieron un índice de desempeño que no presenta diferencia significativa con respecto al control -32.15 ± 16.02 y -54.88 ± 8.40 respectivamente (Fig 10B, $p > 0.01$, ANOVA, *post hoc* comparación múltiple de Tukey). Al no existir diferencias significativas en el índice de desempeño entre los dos grupos con tratamiento de TA por las diferentes vías de administración ($p > 0.05$, prueba t de student), unificamos los datos y se creó el grupo TA obteniendo como resultado, un índice de desempeño de -42.64 ± 9.66 , el cual no es significativamente distinto al del grupo control ($p > 0.01$, ANOVA, *post hoc* comparación múltiple de Tukey). Por otro lado, se pudo observar claramente que el grupo inyectado con proteína beta amiloide (barra roja) pasa mayor porcentaje de tiempo en el tercio de la caja donde se encuentra el TMT, obteniendo un índice de 24.29 ± 18.66 . Este índice es significativamente distinto al grupo control, así como al de los demás grupos (Fig 10B, $*p < 0.01$, ANOVA, *post hoc* de comparación múltiple Tukey).

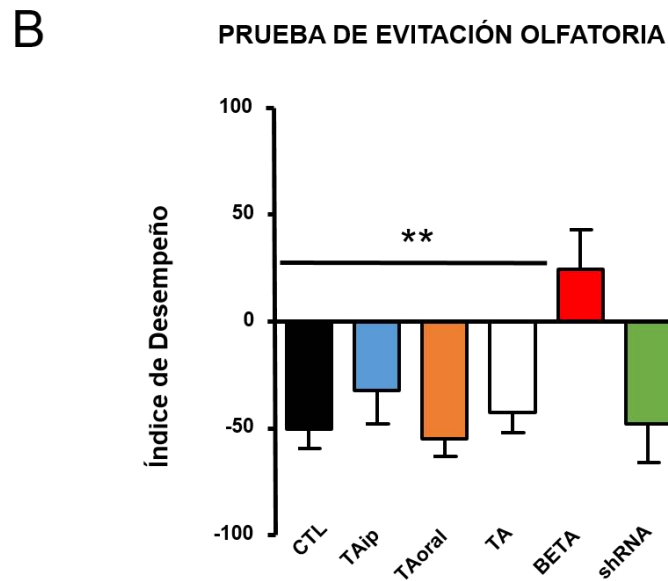
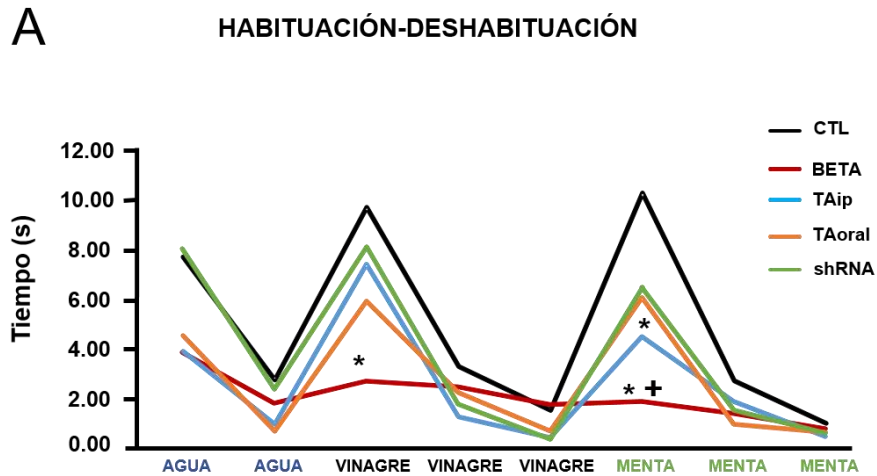


Fig 10 EVALUACIÓN DE LA OLFACCIÓN DE LOS ANIMALES TRATADOS CON EL ÁCIDO TOLFENÁMICO, LA PROTEÍNA A β Y EL shARN PARA EL TRANSCRITO DE TAU. A) Se muestra el tiempo (s) de olfateo para la prueba de HABITUACIÓN-DESHABITUACIÓN en cada presentación de un estímulo inherente y los aromas (Agua, Vinagre y Menta) en el grupo control (CTL, línea negra), el grupo tratado con ácido tolfenámico i.p. (TAi.p., 50mg/Kg, línea azul), el grupo tratado con de ácido tolfenámico oral (TAoral, 50mg/Kg, línea naranja), el grupo beta amiloide (BETA, línea roja) y en el grupo shARN (línea verde) (* p < 0.0001, ANOVA de medidas repetidas, *post hoc* comparación múltiple de Tukey). **B)** Se muestra el índice de desempeño durante la prueba de evitación olfativa. Grupo CTL (barra negra), grupo TAi.p. (barra azul), TAoral (barra naranja), TA datos juntos (barra blanca), grupo Beta Amiloide (barra roja) y prupo shARN (barra verde) (*p < 0.01, ANOVA, *post hoc* comparación múltiple de Tukey).

8. DISCUSIÓN

Los resultados de este trabajo muestran que la aplicación de la proteína A β disminuye la potencia de la actividad espontánea de la capa granular del BOP y que este efecto requiere de la participación de la enzima GSK3, pero no de la proteína tau. Lo anterior, se pudo concluir debido a que la disminución en la expresión de la proteína tau, por la acción de un shARNm para el transcrito de tau, no evita el efecto deletéreo en la potencia de la actividad espontánea del BOP inducido por la presencia de la A β , mientras que la inhibición de la GSK3 si inhibe dicho efecto. Cabe resaltar que este efecto deletéreo de la proteína A β sobre la actividad espontánea de la capa granular del BOP podría relacionarse con las alteraciones olfatorias que se observan en las etapas tempranas del EA (Wesson *et al.*, 2010b; Kawarabayashi *et al.*, 2011; Coronas-Smano *et al.*, 2011) y que la inhibición de la GSK3 podría resultar en un blanco terapéutico contra las mismas (Peña-Ortega *et al.*, 2012; Salgado-Puga y Peña-Ortega, 2015). Es probable que la inhibición de las oscilaciones espontáneas del BOP, producida por la A β y que ahora demostramos que involucra la participación de la GSK3 (pero no de tau) sea el sustrato de la alteración del procesamiento y representación de la información sensorial olfatoria en la EA (Adrian, 1942; Kay *et al.*, 2008). A continuación, se discutirán las posibles alteraciones funcionales de la capa granular del BOP producidas por la A β que pudieran explicar la inhibición de su actividad espontánea en presencia de esta proteína. También, de manera separada, se discutirá la participación de la vía de señalización que involucra a la GSK3, pero no a tau, en este efecto deletéreo de la A β .

8.1 ALTERACIONES PROVOCADAS POR LA APLICACIÓN DE LA A β SOBRE LA ACTIVIDAD ESPONTÁNEA DEL BOP

La actividad oscilatoria espontánea del BOP, así como en otros circuitos neuronales (Shu *et al.*, 2007; Corner, 2008), está determinada por las propiedades intrínsecas de sus elementos neuronales (Corner, 2008; Brea *et al.*, 2009), así

como por sus interacciones sinápticas, siendo la sinapsis dendrodendrítica entre las células mitrales y granulares un elemento fundamental para la funcionalidad del BOP (Lagider *et al.*, 2004). La variedad de patrones de actividad dentro de un circuito neuronal, está determinada, en gran medida, por las propiedades intrínsecas de cada población neuronal (Shu *et al.*, 2007; Corner, 2008; Brea *et al.*, 2009). Además, la combinación de estas propiedades intrínsecas con la interacción sináptica de elementos neuronales dentro de un circuito le confiere la capacidad de generar diferentes patrones oscilatorios que se reflejan en el potencial local de campo (Lizio *et al.*, 2011; Yamamoto y López-Bendito, 2012). Cualquier alteración en la generación de los patrones oscilatorios espontáneos afecta el procesamiento correcto de la información sensorial o perceptual (Kay *et al.*, 2008). Un ejemplo claro de una alteración en los patrones oscilatorios espontáneos se encuentra bien documentado en el EEG de los pacientes con EA, el cual se enlentece, y este efecto correlaciona con el deterioro cognoscitivo (Adler *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2010; Tahaei *et al.*, 2011).

Muchas evidencias indican que las alteraciones en la actividad oscilatoria en el cerebro de los pacientes con EA son producidas por la A β (Lee *et al.*, 2010, Tahaei *et al.*, 2011). Además, experimentos de nuestro laboratorio han demostrado que la aplicación de la A β soluble es capaz de disminuir la actividad espontánea del hipocampo, la corteza entorrinal y el bulbo olfatorio en rebanadas de cerebro de roedores (Balleza-Tapia *et al.*, 2010; Peña-Ortega *et al.*, 2012; Alvarado-Martínez *et al.*, 2013). Lo mismo ocurre cuando la A β es aplicada en condiciones *in vivo* en el hipocampo de la rata (Peña-Ortega *et al.*, 2010; Villette *et al.*, 2010; Peña-Ortega y Bernal-Pedraza, 2012), lo que correlaciona con alteraciones en el desempeño en tareas asociadas a estos circuitos (Alvarado-Martínez *et al.*, 2013; Salgado-Puga *et al.*, 2015).

Los resultados de esta tesis muestran que, de manera similar a lo reportado por Alvarado-Martínez *et al.*, (2013), la aplicación de la A β es capaz de afectar las oscilaciones espontáneas en la capa granular del BOP del ratón, disminuyendo su potencia, tal como ocurre en el hipocampo (Balleza-Tapia *et al.*, 2010; Alvarado-Martínez *et al.*, 2013) y en la corteza entorrinal (Peña-Ortega *et al.*, 2012). De esta

manera, proponemos que la A β soluble afecta el procesamiento de la información olfativa (Alvarado-Martínez *et al.*, 2013), al disminuir la capacidad de BOP para generar actividad oscilatoria poblacional. Esta alteración pudiera ser la base que explique la hiposmia observada en roedores microinyectados con la A β soluble (Alvarado-Martínez *et al.*, 2013), en ratones con fenotipo EA (Wesson *et al.*, 2010b, Kawarabayashi *et al.*, 2011; Coronas-Smano *et al.*, 2011), así como en los pacientes con EA (Doty *et al.*, 1987; Morphy *et al.*, 1990). Es importante mencionar que la concentración de la A β utilizada en este estudio es similar a las concentraciones de la A β encontradas en el líquido cefalorraquídeo (LCR) de pacientes en etapas tempranas de la EA (2.5 - 25 nM, Lue *et al.*, 1999; Näslund *et al.*, 2000). Por el contrario, la aplicación de A β en concentraciones altas puede producir efectos neurodegenerativos tales como la atrofia de las neuritas (DeKosky *et al.*, 1996; Grace *et al.*, 2002; Snyder *et al.*, 2005), la pérdida sináptica (DeKosky *et al.*, 1996; Grace *et al.*, 2002) y la muerte neuronal (Freir y Herron, 2003; Nimmrich *et al.*, 2008). Además, la concentración de A β (30 nM) utilizada en este trabajo correlaciona con las alteraciones cognoscitivas que ocurren en las etapas tempranas de la EA (Lue *et al.*, 1999; Näslund *et al.*, 2000) antes de que aparezcan las placas amiloideas (Wesson *et al.*, 2010b; Cassano *et al.*, 2011) y la muerte neuronal (Lue *et al.*, 1999; Näslund *et al.*, 2000; Walsh *et al.*, 2002); tanto en ratones transgénicos con fenotipo EA (Wesson *et al.*, 2010b; Cassano *et al.*, 2011), como en el humano (Esiri y Wilcok, 1984; Ohm y Braak, 1997). Además, datos de nuestro laboratorio, han mostrado que los efectos de la A β son reversibles, lo que sugiere que el A β afecta la funcionalidad del BOP sin producir neurodegeneración (Alvarado-Martínez *et al.*, 2013). Lo anterior, sugiere que las alteraciones producidas por la aplicación del A β (30 nM), pudieran ser las causantes de las alteraciones “funcionales” del circuito del BOP en las etapas tempranas de la EA y que estas alteraciones no necesariamente involucran procesos relacionados con la neurodegeneración (Balleza-Tapia *et al.*, 2010; Alvarado-Martínez *et al.*, 2013).

Las alteraciones funcionales que produce la A β soluble podrían involucrar a las interneuronas de la capa granular del BOP (Friedman y Strowbridge, 2000), de

manera análoga a lo que ocurre en el hipocampo (Balleza-Tapia *et al.*, 2010). Sabemos que las interneuronas inhibitoras controlan la sincronización del circuito hipocampal y generan las diversas oscilaciones hipocampales (Whittington *et al.*, 2000; Börgers y Kopell, 2003). Estudios en animales transgénicos han mostrado que la proteína A β altera de manera preferencial a los componentes inhibidores del circuito del hipocampo, disminuyendo la frecuencia de disparo de diversas poblaciones de interneuronas GABAérgicas, así como la frecuencia de los potenciales postinápticos inhibitorios que éstas reciben o bien que generan sobre las neuronas piramidales (Verret *et al.*, 2012; Palop y Mucke, 2010). Las células granulares en el BOP son un equivalente de las interneuronas hipocampales y son indispensables para la generación de oscilaciones en el BOP (Schoppa *et al.*, 1998; Friedman y Strowbridge, 2000). Registros de campo de las células granulares *in vivo*, en animales tanto anestesiados como despiertos, han mostrado que las interneuronas granulares contribuyen en la generación de los ritmos rápidos (gamma), durante la respuesta a la estimulación a un olor (Fukunaga *et al.*, 2014) y que el silenciamiento de estas células con estimulación optogenética, genera una reducción en la potencia los ritmos rápidos durante la respuesta evocada por olores (Fukunaga *et al.*, 2014). De esta forma, las interneuronas de la capa granular se consideran fundamentales para generar la respuesta del BOP ante la presencia de un olor (Fukunaga *et al.*, 2014; Kay *et al.*, 2008) y, es probable que la alteración de los patrones oscilatorios de las células granulares en presencia del A β repercuta de manera importante en alteraciones de la integración de la información sensorial en las estructuras corticales que reciben proyecciones del BOP (Kay *et al.*, 2008; Fukunaga *et al.*, 2014). Además, trabajos previos donde estimulan a las células mitrales y al mismo tiempo inhiben a las interneuronas de la capa granular del BOP con optogenética, han mostrado que la pérdida del balance entre excitación/inhibición generado por la comunicación de estas células, a través de la sinapsis dendrodendríticas (Friedman y Strowbridge, 2003), deteriora la discriminación de olores en una tarea de aprendizaje olfativo. Lo anterior sugiere que una adecuada sincronización neuronal dentro del BOP, mediada por la sinapsis dendrodendrítica, puede ser crítica para la correcta

discriminación de estímulos sensoriales (Lepousez y Lledo, 2013).

Con base en lo discutido en el párrafo anterior, sugerimos que la A β podría inducir el deterioro en la actividad poblacional de la capa granular del BOP al afectar la sinapsis dendrodendrítica de las células granulares y mitrales (Friedman y Strowbridge, 2003). Un elemento clave para el funcionamiento de las sinapsis dendrodendríticas son los receptores glutamatérgicos de tipo NMDA, presentes en las células granulares (Schoppa *et al.*, 1998). La inhibición de estos receptores elimina la generación de la actividad espontánea en el BOP (Schoppa *et al.*, 1998; Friedman y Strowbridge, 2000; Friedman y Strowbridge, 2003). Coincidentemente, se ha demostrado la existencia de la interacción directa e inhibitoria entre los NMDAR y la A β en condiciones *in vitro* y en modelos animales con fenotipo de tipo EA (Snyder *et al.*, 2005; Lacor *et al.*, 2004). Además de la inhibición directa de los receptores tipo NMDA por el A β (Schoppa *et al.*, 1998; Friedman y Strowbridge, 2003; Friedman y Strowbridge, 2000), el A β facilita la endocitosis de los receptores NMDA (Lesne *et al.*, 2005). Proponemos que ambos efectos inhibitorios sobre los NMDAR participan en los efectos deletéreos que ejerce el A β sobre la actividad oscilatoria del BOP (Lesne *et al.*, 2005). Las perturbaciones en la comunicación entre las células granulares y mitrales, provocan la generación errática de las oscilaciones espontáneas en rebanadas de BOP, así como un empobrecimiento en la resolución sensorial olfatoria *in vivo* (Schoppa *et al.*, 1998; Xiong y Chen, 2002; Friedman y Strowbridge, 2003; Bathellier *et al.*, 2006; Rojas-Libano y Kay, 2008). También se ha demostrado que, a nivel presináptico, las células mitrales poseen autoreceptores de tipo NMDA, los cuales también pudieran ser afectados por la A β , repercutiendo en la disminución de la actividad oscilatoria en el BOP (Schoppa *et al.*, 1998; Friedman y Strowbridge, 2000). Múltiples trabajos realizados por el grupo de Arevian (2008, 2009) han indicado que la activación de las células mitrales es necesaria para el reclutamiento de las células granulares en el BOP, a través del receptor NMDA, como un mecanismo necesario para la selección de la información saliente del BOP (Arevian, 2008; 2009; Schoppa *et al.*, 1998). De esta forma, la alteración en la comunicación entre las células mitrales y las células de la capa granular, afecta la generación de oscilaciones espontáneas

en el circuito del BOP y la olfacción misma (Schoppa *et al.*, 1998; Dong *et al.*, 2009). Registros directos de la sinapsis dendrodendríticas y la evaluación del efecto del A β sobre las mismas podrían reforzar la hipótesis ofrecida en esta sección.

8.2 PARTICIPACIÓN DE LA ENZIMA GSK3 EN LAS ALTERACIONES PROVOCADAS POR LA APLICACIÓN DE LA A β SOBRE LA FUNCIONALIDAD DEL BOP

Los datos obtenidos en esta tesis demuestran la participación de la enzima GSK3 en el efecto inhibitorio de la A β sobre la actividad espontánea del bulbo olfatorio. La participación de esta cinasa en la EA ha sido objeto de estudio de varios trabajos (Leroy *et al.*, 2007; Blalock *et al.*, 2004). Por ejemplo, se ha observado que existe un incremento tanto en la actividad de la GSK3 en la corteza frontal (Leroy *et al.*, 2007), como en su expresión en el hipocampo de pacientes con EA (Blalock *et al.*, 2004). Por otra parte, se ha observado una disminución en la muerte neuronal inducida por la A β cuando se utilizan oligonucleótidos específicos para evitar la expresión de la GSK3 (Takashima *et al.*, 1993). Resultados de nuestro laboratorio han demostrado que la proteína A β es capaz de inhibir las oscilaciones beta-gamma en la corteza entorrinal a través de un mecanismo que requiere de la activación de la cinasa GSK3 (Peña-Ortega *et al.*, 2012). La GSK3 juega un papel central en la neuropatología provocada por la A β , así como en la sobrefosforilación de la proteína tau (Takashima *et al.*, 1993). Incluso, se ha reportado la existencia de un polimorfismo en el promotor del gen que codifica para la GSK3 como un factor de riesgo para el desarrollo de la EA (Mateo *et al.*, 2006). Nuestros resultados muestran que la inhibición de la cinasa GSK3 previene el efecto inhibitorio de las oscilaciones del bulbo olfatorio causadas por la aplicación de la A β (Fig 6 y 7). Existe evidencia que demuestra que la inhibición farmacológica de la GSK3 (Koh *et al.*, 2008), disminuye la muerte neuronal y la sobrefosforilación de tau provocadas por la A β (Koh *et al.*, 2008). Coincidentemente, existe evidencia que demuestra que el aumento de la producción de la A β está relacionado con la activación de la GSK3 (Hooper *et al.*,

2008) y la GSK3 activada co-localiza con las neuritas distróficas y las marañas neurofibrilares (Yamaguchi *et al.*, 1996; Imahori y Uchida, 1997; Pei *et al.*, 1999). De manera similar a los efectos deletéreos producido por el A β , el aumento de la actividad de la GSK3, en modelos *in vivo*, provoca una alteración en la memoria espacial (Wang *et al.*, 2008), así como alteraciones de la generación de LTP en el hipocampo (Shipton *et al.*, 2011). A pesar de que hay un reporte que indica que la activación de la GSK3, en condiciones fisiológicas, parece estar relacionada al procesamiento de la información olfatoria y a la regulación de la actividad neuronal espontánea en el BOP (Xu *et al.*, 2013), existe evidencia que demuestra que en ratones transgénicos que sobre-expresan a la enzima GSK3, presentan un deterioro en el aprendizaje espacial relacionado a un aumento en la actividad de la GSK3 en el hipocampo (Hernández *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2003). Además, existe evidencia que señala que la actividad de la GSK3 es capaz de abolir el transporte axonal en presencia de la proteína A β (Vossel *et al.*, 2015). Esto hecho, nos indica que la proteína A β inhibe el funcionamiento axonal a través de la activación de GSK3 (Vossel *et al.*, 2015). Estos datos correlacionan con un estudio realizado por Hu *et al.*, (2013), donde demuestran que la ausencia de inhibición de la GSK3 puede tener efectos perjudiciales progresivos sobre plasticidad del hipocampo y el transporte axonal (Hu *et al.*, 2013). En relación a esta plasticidad del hipocampo, otro estudio realizado en rebanadas de cerebro de rata, reportó que la activación de GSK3 y/o la sobreexpresión de la enzima, suprime la inducción de la potenciación a largo plazo (LTP) en el hipocampo de rata (Zhu *et al.*, 2011). Adicionalmente, la inhibición farmacológica de la GSK3 inducida por la aplicación de litio o SB216763 (fármacos utilizados en este trabajo) conserva la inducción de la LTP en estos mismos animales (Zhu *et al.*, 2011). También existe evidencia de que la inhibición farmacológica de la GSK3 con litio y con el inhibidor VIII de la GSK3, previene la sobrefosforilación de la proteína tau y la muerte neuronal inducida por la A β (Álvarez *et al.*, 1999; Koh *et al.*, 2008). De esta forma, los autores de todos estos trabajos concluyen que la activación de GSK3 deteriora la plasticidad sináptica, lo que puede ser la base del deterioro de la memoria en la EA (Zhu *et al.*, 2011). Así pues, la evidencia sugiere que la A β promueve la

sobreactivación de la GSK3 favoreciendo una función aberrante de la enzima que podría llevar a un aumento en la fosforilación de la proteína tau (Lesort *et al.*, 1999). La participación de la proteína tau en los efectos de la A β en el BOP será discutida en la siguiente sección, pero, independientemente de la participación, o no, de esta proteína, las evidencias resumidas en esta sección podrían explicar en parte, la participación de la GSK3 en las alteraciones que subyacen a los procesos cognoscitivos en los pacientes con EA (Vossel *et al.*, 2015; Zhu *et al.*, 2011; Hu *et al.*, 2013).

8.3 AUSENCIA DE PARTICIPACIÓN DE LA PROTEÍNA TAU EN LAS ALTERACIONES PROVOCADAS POR LA APLICACIÓN DE LA A β EN EL BOP.

Uno de los blancos de la GSK3 es la proteína tau (Mondragón-Rodríguez *et al.*, 2012), la cual, una vez fosforilada muestra una disminución en su afinidad por los microtúbulos, lo que provoca la desestabilización de los mismos (Lovestone *et al.*, 1996; Sánchez *et al.*, 2000; Cash *et al.*, 2003). Esta desestabilización de los microtúbulos es perjudicial para el transporte axonal (Sergeant *et al.*, 2008), lo que ocasiona un deterioro en la función neuronal, así como en el aprendizaje y la memoria espacial (Liu *et al.*, 2003). En situaciones patológicas como la EA la proteína tau hiperfosforilada se acumula en el compartimento somatodendrítico, formando ovillos neurofibrilares, los cuales son estructuras intracelulares compuestas por filamentos helicoidales apareados (PHF, Kidd, 1963; Spillantini y Goedert, 2013; Stoothoff y Johnson, 2005). Uno de los mecanismos por los cuales la proteína tau puede deteriorar el transporte axonal, es a través de la interacción con las proteínas dineína/dinactina las cuales, son parte de la maquinaria para el transporte anterógrado a lo largo del axón (Magnani *et al.*, 2007). Magnani y cols. (2007) mostraron que el complejo dineína/dinactina puede verse afectado por la hiperfosforilación de la proteína tau, lo que provoca la desestabilización de los microtúbulos y el deterioro en el transporte anterógrado de las neuronas (Magnani *et al.*, 2007; Sergeant *et al.*, 2008). Otro de los mecanismos involucrados en el deterioro de la comunicación en los circuitos neuronales mediado por la proteína tau hiperfosforilada, es la alteración de la densidad postsináptica (PSD por sus

siglas en inglés, Ittner *et al.*, 2011). Estudios realizados en cultivos celulares reportan que las neuronas que sobre expresan una forma mutante de la proteína tau (P301L; que simula hiperfosforilación) no presentan una formación adecuada en la PSD (Hoover *et al.*, 2010). Estas alteraciones en la PSD deterioran la transmisión sináptica (Hoover *et al.*, 2010), lo que correlaciona con estudios realizados en ratones rTg4510, que sobreexpresan la proteína tau con la misma mutación, los cuales muestran alteraciones en la función sináptica y la pérdida de las mismas (Crimmins *et al.*, 2011; 2012; 2013; Kopeikina *et al.*, 2013A; 2013b; Rocher *et al.*, 2010). Estos mismos animales muestran alteraciones olfatorias (Hu *et al.*, 2015). En este caso, se plantea que la proteína tau hiperfosforilada puede alterar la activación del receptor de NMDA por un aumento en su fosforilación (Ittner *et al.*, 2011; Mondragón-Rodríguez *et al.*, 2012). De igual manera, la proteína tau hiperfosforilada puede inducir la internalización de los receptores AMPA en presencia de la A β (Miller *et al.*, 2014). Además, se ha demostrado que los cambios patológicos en la proteína tau pueden afectar la generación de ritmos hipocámpales (Cantero *et al.*, 2011) y afectar el aprendizaje y la consolidación de la información (Ciupek *et al.*, 2015).

Los datos resumidos en el párrafo anterior evidencian la participación de la proteína tau en algunas de las alteraciones producidas por la A β . Sin embargo, nuestros resultados muestran que la proteína tau no es requerida para el efecto deletéreo de la proteína A β sobre la actividad espontánea de la capa granular del BOP. Por una parte, encontramos que el TA previene los efectos de la A β pero que esto no se relaciona con cambios en la proteína tau. Por el contrario, la disminución del ARNm de tau con shARN no generó protección alguna contra los efectos provocados por la A β .

Si bien se había reportado que los efectos benéficos del ácido tolfenámico involucraban una disminución en la proteína tau (Adwan *et al.*, 2014), este no parece ser el caso en nuestras condiciones experimentales. Alternativamente, nuestros datos sugieren que los efectos protectores del TA en contra de los efectos inhibidores de la A β sobre la actividad del BOP, podría involucrar otros blancos moleculares. Por ejemplo, se ha reportado que el TA es capaz de activar a

la cinasa activada por adenosina monofosfato (AMP cinasa o AMPK, por sus siglas en inglés), (Chi *et al.*, 2011), misma que es inhibida en presencia de la A β vivo (Park *et al.*, 2012; Lin *et al.* 2016). De hecho, la inhibición de la AMPK en presencia de la A β promueve la apoptosis (Lai *et al.*, 2016), por lo que la activación de esta cinasa por TA podría prevenir los efectos deletéreos de la A β (Chi *et al.*, 2011).

Por otro lado, nuestros resultados sugieren que el efecto deletéreo de la A β en el circuito del BOP no requiere la participación de la proteína tau. Cabe mencionar que la nuestra no es una observación aislada, pues existe evidencia de que la hiperfosforilación de tau tiene un impacto limitado en pruebas olfatorias (Martel *et al.*, 2015). Adicionalmente, se ha reportado que la proteína tau no es requerida para la interrupción del transporte axonal rápido (FAT, por sus siglas en inglés) producida por la A β en neuronas hipocampales (Ramser *et al.*, 2013, Gan *et al.*, 2015). Esta serie de experimentos muestran que los oligómeros de la A β reducen el transporte vesicular del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) en las neuronas hipocampales de tejido de ratones control, así como de ratones knock-out de la proteína tau (Ramser *et al.*, 2013; Gan *et al.*, 2015). Al mismo tiempo estas investigaciones sugieren que la calcineurina (CaN), una fosfatasa dependiente de calcio implicada en la patogénesis de la EA y que se encuentra muy activa durante la progresión de la enfermedad, es la responsable de este efecto de la A β (Ramser *et al.*, 2013; Gan *et al.*, 2015). Así mismo, un estudio realizado por Sofola *et al.*, (2010), demostró que la inhibición farmacológica de GSK3 por tratamiento con litio, evita la toxicidad inducida por la A β en un modelo de la mosca *Drosophila* en ausencia de la expresión de la proteína tau endógena (Sofola *et al.*, 2010). En otro estudio realizado en cultivos celulares por Furgerson *et al.*, (2012), se mostró que la muerte neuronal inducida por la A β no requiere la participación de la proteína tau (Furgerson *et al.*, 2012), pero que si involucra la activación de vías apoptóticas (Furgerson *et al.*, 2012). Todavía está por determinarse cuáles blancos de la GSK3, independientes de la proteína tau, son los involucrados en los efectos deletéreos de la A β sobre la actividad del BOP.

9. CONCLUSIONES

- La proteína A β inhibe la actividad oscilatoria espontánea de la capa granular del BOP del ratón.
- El efecto inhibitorio de la A β involucra la activación de la enzima GSK3, sin embargo, el papel de la proteína tau en el BOP queda aún por determinar.
- El efecto deletéreo de la aplicación de la A β sobre la función del BOP es prevenido por el ácido tolfenámico a través de un mecanismo por determinar (pero que parece no involucrar a la proteína tau).

10. REFERENCIAS

- Abbott JJ, Howlett DR, Francis PT, Williams RJ. (2008). *A-beta (1-42) modulation of Akt phosphorylation via alpha7 nAChR y NMDA receptors*. *Neurobiol Aging* 29, 992-1001.
- Abdelrahim M, Baker CH, Abbruzzese JL, Safe S, (2006). *Tolfenamic acid and pancreatic cancer growth, angiogenesis, and Sp protein degradation*. *J. Natl. Cancer Inst.* 98, 855-868.
- Adaya-Villanueva A, Orda B, Balleza-Tapia H, Márquez-Ramos A, Peña-Ortega F. (2010). *Beta-like hippocampal network activity is differentially affected by amyloid beta peptides*. *Peptides* 31, 1761-1766.
- Adrian ED. (1942). *Olfactory reactions in the brain of the hedgehog*. *J Physiol.* 100, 459-473.
- Adwan L, Subaiea Gehad M, Basha Riyaz Zawia, Nasser H. (2014). *Tolfenamic acid reduces tau and CDK5 levels: implications for dementia and tauopathies*. *J. Neurochem.*
- Alonso A, Zaidi T, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. (1994). *Role of abnormally phosphorylated tau in the breakdown of microtubules in Alzheimer disease*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91, 5562–5566.
- Alonso A, Mederlyova A, Novak M, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. (2004). *Promotion of hyperphosphorylation by frontotemporal dementia tau mutations*. *J. Biol.Chem.* 279, 34873– 34881.
- Alonso A, Li B, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. (2006). *Polymerization of hyperphosphorylated tau into filaments eliminates its inhibitory activity*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 8864–8869.
- Alonso A, Grundke-Iqbal I, and Iqbal K. (2009) *Hyperphosphorylated tau from Alzheimer disease brain is toxic only when not polymerized into filaments.*, *J Biol Chem.*
- Alvarado-Martínez R., Salgado-Puga K, Peña-Ortega F. (2013). *Amyloid beta inhibits olfactory bulb activity and the ability to smell*. *PLoS ONE* 8, 75745.
- Alvarez G, Munoz-Montano JR, Satrustegui J, Avila J, Bogónez E, Díaz-Nido J. (1999). *Lithium protects cultured neurons against beta-amyloid-induced neurodegeneration*. *FEBS Lett* 453, 260-264.
- Alzheimer A, Stelzmann R.A, Schnitzlein HN, Murtagh FR. (1995). *An English translation of Alzheimer's 1907 paper, Uber eine eigenartige Erkankung der Hirnrinde*. *Clin Anat* 8, 429-431.
- Amos LA. (2014). *Why do brains need tau (MAPT)?* *The FEBS Journal.* 281, IV-V.
- Anderson KL. y Ferreira A. (2004). *Alpha 1 Integrin activation: a link between beta-*

amyloid deposition y neuronal death in aging hippocampal neurons. J Neurosci Res 75, 688-697.

Apostolova LG, Akopyan GG, Partiali N, Steiner CA, Dutton RA, Hayashi KM, Dinov ID, Toga AW, Cummings JL, Thompson PM. (2007). *Structural correlates of apathy in Alzheimer's disease.* Dement Geriatr Cogn Disord 24, 91-97.

Arevian AC, Kapoor V, Urban NN. (2008). *Activity-dependent gating of lateral inhibition in the mouse olfactory bulb.* Nat Neurosci 11, 80-87

Arnaiz E. y Almkvist O. (2003). *Neuropsychological features of mild cognitive impairment and preclinical Alzheimer's disease.* Acta Neurol Scand Suppl 179, 34-41.

Arnold SE, Lee EB, Moberg PJ, Stutzbach L, Kazi H, Han LY, Lee VM, Trojanowski JQ. (2010). *Olfactory epithelium amyloid-beta and paired helical filament-tau pathology in Alzheimer disease.* Ann Neurol 67, 462-469.

Artieda J, Alegre M, Valencia M, Urrestarazu E, Pérez Alcázar M, Nicolás MJ, Azcárate JL, Iriarte J. (2009). *Brain oscillations: pathophysiological and therapeutic role in some neurological and psychiatric diseases.* An. Sist. Sanit. Navar. 32, 45-60.

Attems J, Lintner F, Jellinger KA. (2005). *Olfactory involvement in aging and Alzheimer's disease: an autopsy study.* J Alzheimer's Dis. 7, 149-57.

Averback P. (1983). *Two new lesions in Alzheimer's disease.* Lancet 2, 1203.

Avila J, Lucas JJ, Perez M, Hernandez F. (2004). *Role of tau protein in both physiological and pathological conditions.* Physiol. Rev. 54, 361-384.

Backman L., Jones S, Berger AK, Laukka EJ, Small BJ. (2005). *Cognitive impairment in preclinical Alzheimer's disease: a meta-analysis.* Neuropsychology 19, 520-531.

Bahar-Fuchs A, Chetelat G, Villemagne VL, Moss S, Pike K, Masters CL, Rowe C, Savage G. (2010). *Olfactory deficits and amyloid-beta burden in Alzheimer's disease, mild cognitive impairment, and healthy aging: a PiB PET study.* J Alzheimer's Dis 22, 1081-1087.

Balaraman Y, Limaye A R, Levey AI, Srinivasan S. (2006). *Glycogen synthase kinase 3beta and Alzheimer's disease: pathophysiological and therapeutic significance.* Cell Mol Life Sci 63, 1226-1235.

Balleza-Tapia H y Peña F. (2009). *Pharmacology of the intracellular pathways activated by amyloid beta protein.* Mini Rev Med Chem 9, 724-740.

Balleza-Tapia, H, Huanosta-Gutiérrez A, Márquez-Ramos A, Arias N, Peña F. (2010). *Amyloid beta oligomers decrease hippocampal spontaneous network activity in an age-dependent manner.* Curr. Alzheimer Res 7, 453-462.

Barber RC. (2010). *Biomarkers for early detection of Alzheimer disease*. J Am Osteopath Assoc 110, S10-15.

Bennett MR. (2000). *The concept of long term potentiation of transmission at synapses*. Prog Neurobiol 60, 109-137.

Binder L I, Frankfurter A, Rebhun LI. (1985). *The distribution of tau in the mammalian central nervous system*. J Cell Biol 101, 1371-1378.

Bittner T, Fuhrmann M, Burgold S, Ochs SM, Hoffmann N, Mitteregger G, Kretschmar H, LaFerla FM, Herms J. (2010). *Multiple events lead to dendritic spine loss in triple transgenic Alzheimer's disease mice*. PLoS One 5, 15477.

Blalock EM, Geddes JW, Chen KC, Porter NM, Markesbery WR, Landfield PW. (2004). *Incipient Alzheimer's disease: microarray correlation analyses reveal major transcriptional and tumor suppressor responses*. Proc. Natl. Acad. Sci. 101, 2173-2178.

Blennow K, de Leon MJ, Zetterberg H. (2006). *Alzheimer's disease*. Lancet 368, 387-403.

Bonefeld BE, Elfving B y Wegener G. (2008). *Reference Genes for Normalization: A Study of Rat Brain Tissue*. SYNAPSE 62, 302-309

Bozzo C, Lombardi G, Santoro C, Canonico PL. (2004). *Involvement of beta (1) integrin in betaAP-induced apoptosis in human neuroblastoma cells*. Mol Cell Neurosci 25, 1-8.

Bowen JD, Malter AD, Sheppard L, Kukull WA, McCormick WC, Teri L, Larson EB. (1996). *Predictors of mortality in patients diagnosed with probable Alzheimer's disease*. Neurology 47, 433-439.

Bradley CA, Peineau S, Taghibiglou C, Nicolas CS, Whitcomb DJ, Bortolotto ZA, et al. (2012). *A pivotal role of GSK-3 in synaptic plasticity*. Front. Mol. Neurosci. 5, 13

Bracco L, Gallato R, Grigoletto F, Lippi A, Lepore V, Bino G, Lazzaro MP, Carella F, Piccolo T, Pozzilli C,. (1994). *Factors affecting course and survival in Alzheimer's disease. A 9-year longitudinal study*. Arch Neurol 51, 1213-1219.

Braak H. y Braak E. (1991). *Neuropathological staging of Alzheimer- related changes*. Acta Neuropathol. 82, 239-259.

Braak H, Alafuzoff I, Arzberger T, Kretschmar H, Del Tredici K. (2006). *Staging of Alzheimer disease-associated neurofibrillary pathology using paraffin sections and immunocytochemistry*. Acta Neuropathol 112, 389-404.

Bressler SL. (1987). *Relation of olfactory bulb and cortex. II. Model for driving of cortex by bulb*. Brain Res 409, 294-301.

Brookmeyer R., Gray S, Kawas C. (1998). *Projections of Alzheimer's disease in the United States and the public health impact of delaying disease onset*. Am J Public Health 88, 1337-1342.

Buck LB. (1996). *Information coding in the vertebrate olfactory system*. Annu Rev Neurosci 19, 517-544.

Burdick D, Soreghan B, Kwon M, Kosmoski J, Knauer M, Henschen A, Yates J, Cotman C, Glabe C. (1992). *Assembly and aggregation properties of synthetic Alzheimer's A4/beta amyloid peptide analogs*. J Biol Chem 267, 546-554.

Burns A, Jacoby R, Levy R. (1990). *Behavioral abnormalities and psychiatric symptoms in Alzheimer's disease: preliminary findings*. Int Psychogeriatr. 2, 25-36.

Burns A, Lewis G, Jacoby R, Levy R. (1991). *Factors affecting survival in Alzheimer's disease*. Psychol Med 21, 363-370.

Cantero JL, Moreno-Lopez B, Portillo F, Rubio A, Hita-Yañez E, y Avila J. (2011). *Role of tau protein on neocortical and hippocampal oscillatory patterns*. Hippocampus 21, 827–834.

Carlesimo GA y Oscar-Berman M. (1992). *Memory deficits in Alzheimer's patients: a comprehensive review*. Neuropsychol Rev 3, 119-169.

Cash AD, Aliev G, Siedlak SL, Nunomura A, Fujioka H, Zhu X, Raina AK, Vinters HV, Tabaton M, Johnson AB, Paula-Barbosa M, Avila J, Jones PK, Castellani RJ, Smith MA, Perry G. (2003). *Microtubule Reduction in Alzheimer's Disease and Aging Is Independent of tau Filament Formation*. Am J Pathol 162, 1623-1627.

Cassano T, Romano A, Macheda T, Colangeli R, Cimmino CS, Petrella A, LaFerla FM, Cuomo V, Gaetani S. (2011). *Olfactory memory is impaired in a triple transgenic model of Alzheimer disease*. Behav Brain Res 224, 408-412.

Chan, RC, Shum D, Toulopoulou T, Chen EY. (2008). *Assessment of executive functions: review of instruments and identification of critical issues*. Arch Clin Neuropsychol 23, 201-216.

Chapman J, Korczyn AD, Karussis DM, Michaelson DM. (2001). *The effects of APOE genotype on age at onset and progression of neurodegenerative diseases*. Neurology 57, 1482-1485.

Chartier-Harlin MC, Crawford F, Houlden H, Warren A, Hughes D, Fidani L, Goate A, Rossor M, Roques P, Hardy J. (1991). *Early-onset Alzheimer's disease caused by mutations at codon 717 of the beta-amyloid precursor protein gene*. Nature 353, 844-846.

Chen S, Ge X, Chen Y, Lv N, Liu Z, Yuan W. (2013). *Advances with RNA interference in Alzheimer's disease research*. Drug Design. Development and Therapy. 7,117–125

Christen-Zaech S, Kraftsik R, Pillevuit O, Kiraly M, Martins R, Khalili K. and Miklossy J. (2003). *Early Olfactory Involvement in Alzheimer's Disease*. The Canadian Journal of Neurological sciences. 30, 20-25.

Chi Y, Li K, Yan Q, Koizumi S, Shi L, Takahashi S, Zhu Y, Matsue H, Takeda M, Kitamura M and Yao J. (2011). *Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drug Flufenamic Acid Is a Potent Activator of AMP-Activated Protein Kinase*. JPET 339, 257–266,

Cirrito JR, Yamada KA, Finn MB, Sloviter RS, Bales KR, May PC, Schoepp DD, Paul SM, Mennerick S, Holtzman DM. (2005). *Synaptic activity regulates interstitial fluid amyloid-beta levels in vivo*. Neuron 48, 913-922.

Ciupek SM, Cheng J, Ali YO, Lu HC and Ji D. (2015). *Progressive Functional Impairments of Hippocampal Neurons in a Tauopathy Mouse Model*. The Journal of Neuroscience 35, 8118–8131.

Colom LV, Castaneda MT, Bañuelos C, Puras G, García-Hernández A, Hernandez S, Mounsey S, Benavidez J, Lehker C. (2010). *Medial septal beta-amyloid 1-40 injections alter septo-hippocampal anatomy and function*. Neurobiol Aging 31, 46-57.

Costantini CF, Rossi F, Formaggio E, Bernardoni R, Cecconi D, Della-Bianca V. (2005). *Characterization of the signaling pathway downstream p75 neurotrophin receptor involved in beta-amyloid peptide-dependent cell death*. J Mol Neurosci 25, 141-156.

Corder E.H, Lannfelt L, Bogdanovic N, Fratiglioni L, Mori H. (1998). *The role of APOE polymorphisms in late-onset dementias*. Cell Mol Life Sci 54, 928-934.

Coronas-Sámano G, Medina-Aguirre I, Aguilar A, Portillo-Martínez W, González-Luna I, Paredes-Guerrero R y Díaz-Cintra S. (2011). *Conducta olfativa en un modelo murino de Alzheimer*. Rev Dig Univ 12, 1067-1079.

Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA. (1995). *Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B*. Nature 378, 785-789.

Csaba Z, Dournaud P. (2001). *Cellular biology of somatostatin receptors*. Neuro- peptides 35, 1e23.

Cullen WK, Wu J, Anwyl R, Rowan MJ. (1996). *Beta-Amyloid produces a delayed NMDA receptor-dependent reduction in synaptic transmission in rat hippocampus*. Neuroreport 8, 87-92.

Dajani R, Fraser E, Roe SM, Young N, Good V, Dale TC, Pearl LH. (2001). *Crystal structure of glycogen synthase kinase 3 beta: structural basis for phosphate-primed substrate specificity and autoinhibition*. Cell 105, 721-732.

De Felice FG, Velasco PT, Lambert MP, Viola K, Fernandez SJ, Ferreira ST, Klein WL.

(2007). *A-beta oligomers induce neuronal oxidative stress through an N-methyl-D-aspartate receptor-dependent mechanism that is blocked by the Alzheimer drug memantine.* J Biol Chem 282, 11590-11601.

De Toledo Ferraz Alves, TC, Ferreira LK, Wajngarten M, Busatto GF. (2010). *Cardiac disorders as risk factors for Alzheimer's disease.* J Alzheimers Dis 20, 749-763

Detera-Wadleigh SD. (2001). *Lithium-related genetics of bipolar disorder.* Ann Med 33, 272-285.

DeKosky ST, Scheff SW, Styren SD. (1996). *Structural correlates of cognition in dementia: quantification and assessment of synapse change.* Neurodegeneration 5, 417-421.

Doty RL, Reyes PF, Gregor T. (1987). *Presence of both odor identification and detection deficits in Alzheimer's disease.* Brain Res Bull 18, 597-600.

Drechsel DN, Hyman AA, Cobb MH, Kirschner MW. (1992). *Modulation of the dynamic instability of tubulin assembly by the microtubule-associated protein tau.* Mol Biol Cell 3, 1141-1154.

Dineley KT, Westerman M, Bui D, Bell K, Ashe KH, Sweatt JD. (2001). *Beta-amyloid activates the mitogen-activated protein kinase cascade via hippocampal alpha7 nicotinic acetylcholine receptors: In vitro and in vivo mechanisms related to Alzheimer's disease.* J Neurosci 21, 4125-4133.

Dineley KT, Bell KA, Bui D, Sweatt JD. (2002). *Beta-Amyloid peptide activates alpha 7 nicotinic acetylcholine receptors expressed in Xenopus oocytes.* J Biol Chem 277, 25056-25061.

Doble BW y Woodgett JR. (2003). *GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase.* J Cell Sci 116, 1175-1186.

Domínguez A, Almeida S, da Cruz e Silva EF, Oliveira CR, Rego AC. (2007). *Toxicity of beta-amyloid in HEK293 cells expressing NR1/NR2A or NR1/NR2B N-methyl-D-aspartate receptor subunits.* Neurochem Int 50, 872-880.

Doraiswamy PM, Steffens DC, Pitchumoni S, Tabrizi S. (1998). *Early recognition of Alzheimer's disease: what is consensual? What is controversial? What is practical?* J Clin Psychiatry 59, 6-18.

Embi N, Rylatt DB, Cohen P. (1980). *Glycogen synthase kinase-3 from rabbit skeletal muscle. Separation from cyclic-AMP-dependent protein kinase and phosphorylase kinase.* Eur J Biochem 107, 519-527.

Esiri MM, Wilcock GK. (1984). *The olfactory bulbs in Alzheimer's disease.* J Neurol Neurosurg Psychiatry 47, 56-60.

Facci L, Stevens David y Skaper SD. (2003). *Glycogen synthase kinase-3 inhibitors protect central neurons against excitotoxicity*. 14, 11.

Farrer, LA, Cupples LA, Haines JL, Hyman B, Kukull WA, Mayeux R, Myers RH, Pericak-Vance MA, Risch N, van Duijn CM. (1997). *Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium*. JAMA 278, 1349-1356.

Fontanini A, Bower JM. (2006). *Slow-waves in the olfactory system: an olfactory perspective on cortical rhythms*. Trends Neurosci 29, 429-437

Force T. y Woodgett JR. (2009). *Unique and overlapping functions of GSK-3 isoforms in cell differentiation and proliferation and cardiovascular development*. J Biol Chem 284, 9643-9647.

Forstl H. y Kurz A. (1999). *Clinical features of Alzheimer's disease*. Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci 249, 288-290.

Frandemiche ML, De Seranno S, Rush T, Borel E, Elie A, Arnal I, Lanté F, Buisson A. (2014). *Activity-dependent tau protein translocation to excitatory synapse is disrupted by exposure to amyloid-beta oligomers*. J. Neurosci 34, 6084–6097.

Frank EM. (1994). *Effect of Alzheimer's disease on communication function*. J S C Med Assoc 90, 417-423.

Friedman D y Strowbridge BW (2000). Functional role of NMDA autoreceptors in olfactory mitral cells. *J Neurophysiol* 84, 39-50

Friedman D y Strowbridge BW (2003). Both electrical and chemical synapses mediate fast network oscillations in the olfactory bulb. *J Neurophysiol* 89, 2601-2610.

Furgerson M, Fechheimer M, Furukawa R. (2012). *Model Hirano Bodies Protect against Tau-Independent and Tau-Dependent Cell Death Initiated by the Amyloid Precursor Protein Intracellular Domain*. PlosOne, 7, e44996.

Gan KJ y Silverman MA. (2015). *Dendritic and axonal mechanisms of Ca²⁺ elevation impair BDNF transport in A β oligomer-treated hippocampal neurons*. Molecular Biology of the Cell 26, 1058-1071.

Garcia-Osta A, Alberini CM. (2009). *Amyloid beta mediates memory formation*. Learn Mem 16, 267-272.

Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L, Giuffra L, Haynes A, Irving N, James L. (1991). *Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease*. Nature 349, 704-706.

Goedert M, Jakes R, Crowther RA, Six J, Lubke U, Vandermeeren M, Cras P, Trojanowski

JQ, Lee VMY, (1993). *The abnormal phosphorylation of tau protein at Ser-202 in Alzheimer disease recapitulates phosphorylation during development*. Proc. Natl. Acad. Sci. 90, 5066–5070.

Goedert, M. y Spillantini MG. (2006). *A century of Alzheimer's disease*. Science 314, 777-781.

Gould TD y Manji HK. (2002). *The Wnt signaling pathway in bipolar disorder*. Neuroscientist 8, 497-511.

Grimes CA y Jope RS. (2001). *The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3beta in cellular signaling*. Prog Neurobiol 65, 391-426.

Grimmer T, Riemenschneider M, Forstl H, Henriksen G, Klunk WE, Mathis CA, Shiga T, Wester HJ, Kurz A, Drzezga A. (2009). *Beta amyloid in Alzheimer's disease: increased deposition in brain is reflected in reduced concentration in cerebrospinal fluid*. Biol Psychiatry 65, 927-934.

Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Tung YC, Wisniewski HM, (1984). *Alzheimer paired helical filaments: immunochemical identification of polypeptides*. Acta Neuropathol. 62, 259–267.

Grundke-Iqbal I., Iqbal K, Quinlan M, Tung YC, Zaidi MS, Wisniewski HM, (1986). *Microtubule-associated protein tau: a component of Alzheimer paired helical filaments*. J. Biol. Chem. 261, 6084–6089.

Haberly L. (1990). Olfactory cortex in The Synaptic Organization of the Brain. Ed. Shepherd GM 317-45.

Harada A, Oguchi K, Okabe S, Kuno J, Terada S, Ohshima T, Sato-Yoshitake R, Takei Y, Noda T, Hirokawa N. (1994). *Altered microtubule organization in small-calibre axons of mice lacking tau protein*. Nature 369,488–491.

Hashimoto Y, Kaneko Y, Tsukamoto E, Frankowski H, Kouyama K, Kita Y, Niikura T, Aiso S, Bredesen DE, Matsuoka M, Nishimoto I. (2004). *Molecular characterization of neurohybrid cell death induced by Alzheimer's amyloid-beta peptides via p75NTR/PLAIDD*. J Neurochem 90,549-558.

Hebert LE, Scherr PA, Bienias JL, Bennett DA, Evans DA. (2003). *Alzheimer disease in the US population: prevalence estimates using the 2000 census*. Arch Neurol 60, 1119-1122.

Heicklen-Klein A, Ginzburg I. (2000) *Tau promoter confers neuronal specificity and binds Sp1 and AP-2*. J Neurochem 75, 1408-18.

Hernández F, Borrell J, Guaza C, Ávila J, and Lucas J.J. (2002). *Spatial learning deficit in transgenic mice that conditionally over-express GSK-3beta in the brain but do not form tau filaments*. J.Neurochem. 83, 1529–1533.

Henriksen EJ, Kinnick T R, Teachey MK, O'Keefe MP, Ring D, Johnson KW, Harrison SD. (2003). *Modulation of muscle insulin resistance by selective inhibition of GSK-3 in Zucker diabetic fatty rats*. Am J Physiol Endocrinol Metab 284, 892-900.

Henriksen EJ y Dokken BB. (2006). *Role of glycogen synthase kinase-3 in insulin resistance and type 2 diabetes*. Curr Drug Targets 7, 1435-1441.

Heyman A, Wilkinson WE, Hurwitz BJ, Helms MJ, Haynes CS, Utley CM, Gwyther LP. (1987). *Early-onset alzheimer's disease: clinical predictors of institutionalization and death*. Neurology 37, 980-984.

Holmes C. (2002). *Genotype and phenotype in Alzheimer's disease*. Br J Psychiatry 180, 131-134.

Holscher C. (2011). *Diabetes as a risk factor for Alzheimer's disease: insulin signalling impairment in the brain as an alternative model of Alzheimer's disease*. Biochem Soc Trans 39, 891-897.

Hooper C, Killick R, Lovestone S. (2008). *The GSK3 hypothesis of Alzheimer's disease*. J Neurochem 104, 1433-1439.

Hoover BR, Reed MN, Su J, Penrod RD, Kotilinek LA, Grant MK, Pitstick R, Carlson GA, Lanier LM, Yuan LL, Ashe KH, Liao D. (2010). *Tau mislocalization to dendritic spines mediates synaptic dysfunction independently of neurodegeneration*. Neuron 68, 1067–1081.

Hsiao K, Chapman P, Nilsen S, Eckman C, Harigaya Y, Younkin S, Yang F, Cole G. (1996). *Correlative memory deficits, A β elevation, and amyloid plaques in transgenic mice*. Science 274, 99–102.

Hsieh H, Boehm J, Sato C, Iwatsubo T, Tomita T, Sisodia S, Malinow R. (2006). *AMPA removal underlies A β -induced synaptic depression and dendritic spine loss*. Neuron 52, 831-843.

Hu Y, Ding W, Zhu X, Chen R, Wang X. (2015). *Olfactory Dysfunctions and Decreased Nitric Oxide Production in the Brain of Human P301L Tau Transgenic Mice*. Neurochem Res.

Hu YS, Long N, Pigino G, Brady ST, Lazarov O. (2013). *Molecular Mechanisms of Environmental Enrichment: Impairments in Akt /GSK3 β , Neurotrophin-3 and CREB Signaling*. PLOS ONE 64460.

Hudson R, Distel H y Zippel H. (1990). *Perceptual performance in peripherally reduced olfactory systems*. En: Schild (ed). *Information processing of chemical sensory stimuli in biological and artificial systems*. Springer Ver Berlin 259-269.

Hughes K., Nikolakaki E, Plyte SE, Totty NF, Woodgett JR. (1993). *Modulation of the glycogen synthase kinase-3 family by tyrosine phosphorylation*. EMBO J 12, 803-808.

Imahori K. y Uchida T. (1997). *Physiology and pathology of tau protein kinases in relation to Alzheimer's disease*. J Biochem. 121, 179–188.

INEGI (2014). *Estadísticas a propósito del día internacional de las personas de edad (1 de octubre)*, Aguascalientes, Ags. 1-13.

Iqbal K, Grundke-Iqbal I, Zaidi T, Merz PA, Wen GY, Shaikh SS, Wisniewski HM, Alafuzoff I, Winblad B. (1986). *Defective brain microtubule assembly in Alzheimer's disease*. Lancet 2, 421-426.

Ittner LM y Gotz, J. (2011). *Amyloid- β and tau—a toxic pas de deux in Alzheimer's disease*. Nat. Rev. Neurosci. 12, 65–72.

Jarrett JT, Berger EP, Lansbury PT Jr. (1993). *The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease*. Biochemistry 32, 4693-4697.

Jelicic M, Bonebakker AE, Bonke B. (1995). *Implicit memory performance of patients with Alzheimer's disease: a brief review*. Int Psychogeriatr 7, 385-392.

Joo Y, Schumacher B, Landrieu I, Bartel M, Smet-Nocca C, Jang A, Choi HS, Jeon NL, Chang KA, Kim HS, Ottmann C y Suh YH. (2015) *Involvement of 14-3-3 in tubulin instability and impaired axon development is mediated by Tau*. The FASEB Journal, 29, 4133-4143

Kang JE, Lim MM, Bateman RJ, Lee JJ, Smyth LP, Cirrito JR, Fujiki N, Nishino S, Holtzman DM. (2009). *Amyloid- β dynamics are regulated by orexin and the sleep-wake cycle*. Science 326, 1005-1007.

Kauer JS. (1988). *Real-time imaging of evoked activity in local circuits of the salamander olfactory bulb*. Nature 331, 166-168.

Kawarabayashi T, Younkin LH, Saido TC, Shoji M, Ashe KH, Younkin SG. (2001). *Age-dependent changes in brain, CSF, and plasma amyloid (beta) protein in the Tg2576 transgenic mouse model of Alzheimer's disease*. J Neurosci 21, 372-381.

Kay LM. (2005). *Theta oscillations and sensorimotor performance*. Proc Natl Acad Sci 102, 3863-3868.

Kay LM, Beshel J. (2010). *A beta oscillation network in the rat olfactory system during a 2-alternative choice odor discrimination task*. J Neurophysiol 104, 829-839.

Kay LM, Lazzara P. (2010). *How global are olfactory bulb oscillations?* J Neurophysiol 104, 1768-1773.

Kidd M. (1963). *Paired helical filaments in electron microscopy of Alzheimer's disease*. Nature 197, 192–193.

Kihara T, Shimohama S, Sawada H, Honda K, Nakamizo T, Shibasaki H, Kume T, Akaike A. (2001). *Alpha 7 nicotinic receptor transduces signals to phosphatidylinositol 3-kinase to block A beta-amyloid-induced neurotoxicity*. J Biol Chem 276, 13541-13546.

Kim JK, Choi SJ, Bae H, Kim CR, Cho HY, Kim YJ, Lim ST, Kim CJ, Kim HK, Peterson S, Shin DH. (2011). *Effects of Methoxsalen from Poncirus trifoliata on Acetylcholinesterase and Trimethyltin-Induced Learning and Memory Impairment*. Biosci. Biotechnol. Biochem 75, 1984–1989.

Kimura T, Regan P, Piers T, Heo S, Brown C, Hashikawa T, Murayama M, Seok H, Sotiropoulos I, Kim E, Collingridge GL, Takashima A, Cho K. (2014). *Microtubule-associated protein tau is essential for long-term depression in the hippocampus*. Phil. Trans. R. Soc. B 369, 2013-2044.

Koh SH, Noh M.Y, Kim SH. (2008). *Amyloid-beta-induced neurotoxicity is reduced by inhibition of glycogen synthase kinase-3*. Brain Res 1188, 254-262.

Koike MA, Garcia FG, Kitazawa M, Green KN, Laferla FM. (2011). *Long term changes in phospho-APP and tau aggregation in the 3xTg-AD mice following cerebral ischemia*. Neurosci Lett 495, 55-59.

Kojro E, Gimpl G, Lammich S, Marz W, Fahrenholz F. (2001). *Low cholesterol stimulates the nonamyloidogenic pathway by its effect on the alpha secretase ADAM 10*. Proc Natl Acad Sci 98, 5815-5820.

Kopeikina KJ, Polydoro M, Tai HC, Yaeger E, Carlson GA, Pitstick R, Hyman, BT and Spires-Jones TL. (2013a). *Synaptic alterations in the rTg4510 mouse model of tauopathy*. J. Comp. Neurol. 521, 1334–1353.

Kopeikina KJ, Wegmann SK, Pitstick R, Carlson GA, Bacskai BJ, Betensky RA, Hyman BT y Spires-Jones TL. (2013b). *Tau causes syn-apse loss without disrupting calcium homeostasis in the rTg4510 model of tau- oopathy*. PLoS ONE 8, e80834

Koros, E. y Dorner-Ciossek C. (2007). *The role of glycogen synthase kinase-3beta in schizophrenia*. Drug News Perspect 20, 437-445.

Kovacs T, CairnsNJ, Lantos PL. (2001). *Olfactory centres in Alzheimer's disease: olfactory bulb is involved in early Braak's stages*. Neuroreport 12, 285–8.

Kremer A, Louis JV, et al. (2011). *GSK3 and Alzheimer's Disease: Facts and Fiction*. Front Mol Neurosci 4, 17.

Laaris N, Puche A, Ennis M. (2007). *Complementary postsynaptic activity patterns elicited*

in olfactory bulb by stimulation of mitral/tufted and centrifugal fiber inputs to granule cells. J Neurophysiol 97, 296-306.

Lacor PN, Buniel MC, *et al.* (2004). *Synaptic targeting by Alzheimer's-related amyloid beta oligomers.* J Neurosci 24, 10191-10200.

Lacor PN, Buniel MC, Furlow PW, Clemente AS, Velasco PT, Wood M, Viola KL, Klein WL. (2007). *Abeta oligomer-induced aberrations in synapse composition, shape, and density provide a molecular basis for loss of connectivity in Alzheimer's disease.* J Neurosci 27, 796-807.

Lazarini F, Gabellec MM, Moigneu C, de Chaumont F, Olivo-Marin JC and Lledo PM. (2014). *Adult Neurogenesis Restores Dopaminergic Neuronal Loss in the Olfactory Bulb.* The Journal of Neuroscience 34,14430 –14442.

Le Pichon CE, Valley MT, Polymenidou M, Chesler AT, Sagdullaev BT, Aguzzi A, Firestein S (2009). *Olfactory behavior and physiology are disrupted in prion protein knockout mice.* Nat Neurosci 12, 60-69.

Lehtovirta M, J. Partanen, Könönen M, Soininen H, Helisalmi S, Mannermaa A, Ryyänänen M, Hartikainen P, Riekkinen PSr. (1996a). *Spectral analysis of EEG in Alzheimer's disease: relation to apolipoprotein E polymorphism.* Neurobiol Aging 17, 523-526.

Lehtovirta M, Soininen H, Helisalmi S, Mannermaa A, Helkala EL, Hartikainen P, Hänninen T, Ryyänänen M, Riekkinen PJ. (1996b). *Clinical and neuropsychological characteristics in familial and sporadic Alzheimer's disease: relation to apolipoprotein E polymorphism.* Neurology 46, 413-419.

Lepousez G y Lledo PM. (2013). *Odor Discrimination Requires Proper Olfactory Fast Oscillations in Awake Mice.* Neuron 80, 1010–1024.

Leroy K. y Brion J.P. (1999). *Developmental expression and localization of glycogen synthase kinase-3beta in rat brain.* J Chem Neuroanat 16, 279-293.

Leroy K, Yilmaz Z, Brion JP. (2007). *Increased level of active GSK-3beta in Alzheimer's disease and accumulation in argyrophilic grains and in neurones at different stages of neurofibrillary degeneration.* Neuropathol Appl Neurobiol 33, 43-55.

Lesne S, Ali C, Gabriel C, Croci N, MacKenzie ET, Glabe CG, Plotkine M, Marchand-Verrecchia C, Vivien D, Buisson A. (2005). *NMDA receptor activation inhibits alpha-secretase and promotes neuronal amyloid-beta production.* J Neurosci 25, 9367-9377.

Lesort M, Jope R.S. y Johnson G.V. (1999). *Insulin transiently increases tau phosphorylation: involvement of glycogen synthase kinase-3beta and Fyn tyrosine kinase.* J. Neurochem. 72, 576–584.

Lin CL, Cheng YS, Li HH, Chiu PY, Chang YT, Ho YJ, Lai TJ. (2016). *Amyloid-β*

suppresses AMP-activated protein kinase (AMPK) signaling and contributes to α -synuclein-induced cytotoxicity. *Experimental Neurology* 275, 84–98.

Liu GP, Zhang Y, Yao XQ, Zhang CE, Fang J, Wang Q, Wang JZ. (2007). *Activation of glycogen synthase kinase-3 inhibits protein phosphatase-2A and the underlying mechanisms.* *Neurobiol. Aging.*

Liu SJ, Zhang AH, Li HL, Wang Q, Deng HM, Netzer WJ, Xu H, Wang JZ. (2003). *Overactivation of glycogen synthase kinase-3 by inhibition of phosphoinositol-3 kinase and protein kinase C leads to hyperphosphorylation of tau and impairment of spatial memory.* *J Neurochem* 87, 1333–1344.

Livak KJ. y Schmittgen TD. (2001). *Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method.* *Methods* 25, 402–408.

Lopes y Bottino, 2002. *Prevalencia de demencia em diversas regioes do mundo. Análisis de dos estudios epidemiológicos de 1994 a 2000.* *Neuropsi* 60, 61-69.

Lovestone S, Hartley, C. L, Pearce J, and Anderton BH. (1996). *Phosphorylation of tau by glycogen synthase kinase-3 beta in intact mammalian cells: the effects on the organization and stability of microtubules.* *Neuroscience.*

Lovestone S. y Reynolds C.H. (1997). *The phosphorylation of tau: a critical stage in neurodevelopment and neurodegenerative processes.* *Neuroscience* 78, 309-324.

Lucas JJ, Hernandez F, Gomez-Ramos P, Moran M.A, Hen R, and Avila J. (2001). *Decreased nuclear beta-catenin, tau hyperphosphorylation and neurodegeneration in GSK-3beta conditional transgenic mice.* *EMBO J.* 20, 27–39.

Luchsinger JA, Tang MX, Shea S, Mayeux R. (2004). *Hyperinsulinemia and risk of Alzheimer disease.* *Neurology* 63, 1187-1192.

Lue LF, Kuo YM, Roher AE, Brachova L, Shen Y, Sue L, Beach T, Kurth JH, Rydel RE, Rogers J. (1999). *Soluble amyloid beta peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease.* *Am J Pathol* 155, 853-862.

Magnani E, Fan J, Gasparini L, Golding M, Williams M, Schiavo G, Goedert M, Amos L.A y Grazia M. (2007). *Interaction of tau protein with the dynactin complex.* *European Molecular Biology Organization.* 26, 4546–4554.

Maiese K, Chong ZZ, Hou J, Shang YC. (2009). *New strategies for Alzheimer's disease and cognitive impairment.* *Oxid Med Cell Longev* 2, 279-289.

Mann DM, Tucker CM, Yates PO. (1988). *Alzheimer's disease: an olfactory connection?* *Mech Ageing Dev* 42, 1–15.

Manenti R, Repetto C, Bentrovato S, Marccone A, Bates E, Cappa SF. (2004). *The effects of*

ageing and Alzheimer's disease on semantic and gender priming. Brain 127, 2299-2306.

Manoukian, AS y Woodgett JR. (2002). *Role of glycogen synthase kinase-3 in cancer: regulation by Wnts and other signaling pathways. Adv Cancer Res* 84, 203-229.

Maréchal L, Le I, Hannequin D, Campion D y Brice A. (2006). *Alzheimer's disease and other dementias en psychopharmacogenetics*. Editors Gorwood Philip y Michel Hamon Springer Science Business Media, Inc.

Martel G, Simona A, Nocera S, Kalainathan S, Pidoux L, Blumc D, Leclère-Turbant S, Diaz J, Genya D, Moyse E, Videau C, Buéec L, Epelbaum J, Viollet C. (2015). *Aging, but not tau pathology, impacts olfactory performances and somatostatin systems in THY-Tau22 mice. Neurobiology of Aging* 36 1013e1028.

Martin C, Houitte D, Guillermier M, Petit F, Bonvento G, Gurden H. (2012). *Alteration of sensory-evoked metabolic and oscillatory activities in the olfactory bulb of GLAST-deficient mice. Front Neural Circuits* 6, 1.

Martínez-Gil A. (2009). *El Alzheimer.*, 1era ed. Madrid ed. Catarata 21-23.

Masliah E, Terry RD, Alford M, DeTeresa R, Hansen LA. (1991). *Cortical and subcortical patterns of synaptophysinlike immunoreactivity in Alzheimer's disease. Am J Pathol* 138, 235-246.

Maurer U, Preiss F, Brauns-Schubert P, Schlicher L, Charvet C. (2014). *GSK-3 - at the crossroads of cell death and survival. J Cell Sci* 127, 1369-1378.

McKay BE, Placzek AN, Dani JA. (2007). *Regulation of synaptic transmission and plasticity by neuronal nicotinic acetylcholine receptors. Biochem Pharmacol* 74, 1120-1133.

McNaughton N, Ruan M, Woodnorth MA. (2006). *Restoring theta-like rhythmicity in rats restores initial learning in the Morris water maze. Hippocampus* 16, 1102-1110.

McTavish TS, Migliore M, Shepherd GM, Hines ML. (2012). *Mitral cell spike synchrony modulated by dendrodendritic synapse location. Front Comput Neurosci* 6, 3.

Mena-López R, Luna-Muñoz J, García F, Hernández M. (2003). *Histopatología molecular de la enfermedad de Alzheimer. Revista Digital Universitaria* 30 de noviembre de 2003.

Meshulam RI, Moberg PJ, Mahr RN, Doty RL. (1998). *Olfaction in neurodegenerative disease: a meta-analysis of olfactory functioning in Alzheimer's and Parkinson's diseases. Arch Neurol* 55, 84-9.

Miller EC, Teravskis PJ, Dummer BW, Zhao XL, Haganir R and Liao D. (2014). *Tau phosphorylation and tau mislocalization mediate soluble Ab oligomer-induced AMPA glutamate receptor signaling deficit. European Journal of Neuroscience* 39, 1214–1224,

2014

Mondragón-Rodríguez S, Trillaud-Doppia E, Dudilo, A, Bourgeois C, Lauzon M, Leclerc N and Boehm J. (2012a). *Interaction of endogenous tau protein with synaptic proteins is regulated by N-methyl-D-aspartate receptor-dependent tau phosphorylation*. J. Biol. Chem. 287, 32040–32053.

Mondragón-Rodríguez S, P, Zhu X, I, Moreira P and Williams S. (2012b). *Glycogen Synthase Kinase 3: A Point of Integration in Alzheimer's Disease and a Therapeutic Target?* Hindawi Publishing Corporation International Journal of Alzheimer's Disease, Article ID 276803.

Mondragón-Rodríguez S, Perry G, Zhu X, Moreira P, Acevedo-Aquino C y Williams S. (2013). *Phosphorylation of Tau Protein as the Link between Oxidative Stress, Mitochondrial Dysfunction, and Connectivity Failure: Implications for Alzheimer's Disease*. Oxidative Medicine and Cellular Longevity.

Morrison JH. y Hof PR. (1997). *Life and death of neurons in the aging brain*. Science 278, 412-419.

Morsch R, Simon W, Coleman PD. (1999). *Neurons may live for decades with neurofibrillary tangles* J Neuropathol Exp Neurol 58, 188–197.

Mundinano IC, Caballero MC, Ordonez C, Hernandez M, DiCaudo C, Marcilla I. (2011). *Increased dopaminergic cells and protein aggregates in the olfactory bulb of patients with neurodegenerative disorders*. Acta Neuropathol 122, 61–74.

Nakamura S, Murayama N, Noshita T, Annoura H, Ohno T. (2001). *Progressive brain dysfunction following intracerebroventricular infusion of beta(1-42)-amyloid peptide*. Brain Res 912, 128-136.

Naslund J, Haroutunian V, Mohs R, Davis KL, Davies P, Greengard P, Buxbaum JD. (2000). *Correlation between elevated levels of amyloid beta-peptide in the brain and cognitive decline*. JAMA 283, 1571-1577.

Nieuwenhuys V y Van H. (2008). *Telencéfalo: introducción y sistema olfatorio en el sistema nervioso central humano*. 4ta edición.

Nikoulina SE, Ciaraldi TP, Mudaliar S, Mohideen P, Carter L, Henry RR. (2000). *Potential role of glycogen synthase kinase-3 in skeletal muscle insulin resistance of type 2 diabetes*. Diabetes 49, 263-271.

Nimmrich V, Grimm C, Draguhn A, Barghorn S, Lehmann A, Schoemaker H, Hillen H, Gross G, Ebert U, Bruehl C. (2008). *Amyloid beta oligomers (A beta (1-42) globulomer) suppress spontaneous synaptic activity by inhibition of P/Q-type calcium currents*. J Neurosci 28, 788-797.

Nishimura Y, Komatsu S, Ichikawa D, Nagata H, Hirajima S, Takeshita H, Kawaguchi T, Arita T, Konishi H, Kashimoto H, Shiozaki A, Fujiwara S, Okamoto K, Tsuda H y Otsuji E. (2013) *Overexpression of YWHAZ relates to tumor cell proliferation and malignant outcome of gastric carcinoma*. British Journal of Cancer 108, 1324–1331 Oddo S, Caccamo A, Kitazawa M, Tseng BP, LaFerla FM. (2003). *Amyloid deposition precedes tangle formation in a triple transgenic model of Alzheimer's disease*. Neurobiol Aging 24, 1063-1070.

Oddo S, Caccamo A, Kitazawa M, Tseng BP, LaFerla FM. (2003). *Amyloid deposition precedes tangle formation in a triple transgenic model of Alzheimer's disease*. Neurobiol Aging 24, 1063-1070.

Ohm TG y Braak H. (1987). *Olfactory bulb changes in Alzheimer's disease*. Acta Neuropathol 73, 365-369.

Orban G, Volgyi K, Juhász G, Penke B, Kékesi KA, Kardos J, Czurkó A. (2010). *Different electrophysiological actions of 24- and 72-hour aggregated amyloid-beta oligomers on hippocampal field population spike in both anesthetized and awake rats*. Brain Res 1354, 227-235.

Orena SJ, Torchia AJ, Garofalo RS. (2000). *Inhibition of glycogen-synthase kinase 3 stimulates glycogen synthase and glucose transport by distinct mechanisms in 3T3-L1 adipocytes*. J Biol Chem 275, 15765-15772.

Palop J y Mucke L. (2010). *Amyloid- β Induced Neuronal Dysfunction in Alzheimer's Disease: From Synapses toward Neural Networks*. Nat Neurosci 13, 812–818.

Pap M y Cooper GM. (1998). *Role of glycogen synthase kinase-3 in the phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt cell survival pathway*. J Biol Chem 273, 19929-19932.

Pap M y Cooper GM. (2002). *Role of translation initiation factor 2B in control of cell survival by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/glycogen synthase kinase 3beta signaling pathway*. Mol Cell Biol 22, 578-586.

Parihar MS, Brewer GJ. (2010). *Amyloid-beta as a modulator of synaptic plasticity*. J Alzheimer's Dis 22, 741-763.

Park H, Kam TI, Kim Y, Choi H, Gwon Y, Kim C, Koh JY, Jung YK. (2012). *Neuropathogenic role of adenylate kinase-1 in A β -mediated tau phosphorylation via AMPK and GSK3beta*. Hum.Mol. Genet. 21, 2725–2737.

Paxinos. (2004). *The mouse brain in stereotaxic coordinates*. ELSERVIER

Pei JJ, Braak E, Braak H, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Winblad B. and Cowburn RF. (1999). *Distribution of active glycogen synthase kinase 3beta (GSK-3beta) in brains staged for Alzheimer disease neurofibrillary changes*. J. Neuropathol. Exp. Neurol. 58, 1010– 1019.

Peña-Ortega F, Ordaz B, Bernal-Pedraza R, Márquez-Ramos A, Carmona-Aparicio L, Giordano M. (2010). *Beta-amyloid protein (25-35) disrupts hippocampal network activity: Role of Fyn-kinase*. *Hippocampus* 20, 78-96.

Peña-Ortega, F, Solis-Cisneros A, Ordaz B, Balleza-Tapia H, Javier Lopez-Guerrero J. (2012). *Amyloid beta 1-42 inhibits entorhinal cortex activity in the beta-gamma range: role of GSK-3*. *Curr Alzheimer Res* 9, 857-863.

Peña-Ortega F. y Bernal-Pedraza R. (2012). *Amyloid Beta Peptide slows down sensory-induced hippocampal oscillations*. *Int J Pept* 2012, 236289.

Peña-Ortega F. (2013). *Amyloid Beta-Protein and Neural Network Dysfunction* *J Neurodegen Dis* 2013, 657470.

Perez-Madrinan G, Cook SE, Saxton JA, Miyahara S, Lopez OL, Kaufer DI, Aizenstein HJ, DeKosky ST, Sweet RA. (2004). *Alzheimer disease with psychosis: excess cognitive impairment is restricted to the misidentification subtype*. *Am J Geriatr Psychiatry* 12, 449-456.

Perry EK, Kerwin J, Perry RH, Blessed G y Fairbairn AF. (1990). *Visual hallucinations and the cholinergic system in dementia*. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 53, 88.

Plant LD, Boyle JP, Smith IF, Peers C, Pearson HA. (2003). *The production of amyloid beta peptide is a critical requirement for the viability of central neurons*. *J Neurosci* 23, 5531-5535.

Plyte SE, Hughes K, Nikolakaki E, Pulverer BJ, Woodgett JR. (1992). *Glycogen synthase kinase-3: functions in oncogenesis and development*. *Biochim Biophys Acta* 1114, 147-162.

Puzzo D, Privitera L, Leznik E, Fa M, Staniszewski A, Palmeri A, Arancio O. (2008). *Picomolar amyloid-beta positively modulates synaptic plasticity and memory in hippocampus*. *J Neurosci* 28, 14537-14545.

Puzzo D, Privitera L, Fa M, Staniszewski A, Hashimoto G, Aziz F, Sakurai M, Ribe EM, Troy CM, Mercken M, Jung SS, Palmeri A, Arancio O. (2011). *Endogenous amyloid-beta is necessary for hippocampal synaptic plasticity and memory*. *Ann Neurol* 69, 819-830.

Raber J, Huang Y, Ashford JW. (2004). *ApoE genotype accounts for the vast majority of AD risk and AD pathology*. *Neurobiol Aging* 25, 641-650.

Ramsden M, Henderson Z, Pearson HA. (2002). *Modulation of Ca²⁺ channel currents in primary cultures of rat cortical neurones by amyloid beta protein (1-40) is dependent on solubility status*. *Brain Res* 956, 254-261.

Ramser EM, Ganb KJ, Deckera H, Fana EY, Suzukia MM, Ferreirac ST, and Silverman MA. (2013). *Amyloid- β oligomers induce tau-independent disruption of BDNF axonal*

transport via calcineurin activation in cultured hippocampal neurons. Molecular Biology of the Cell. 24, 2494-2505.

Rapoport M, Dawson HN, Binder LI, Vitek MP, Ferreira A. (2002). *Tau is essential to β amyloid-induced neurotoxicity*. Proc Natl Acad Sci 99, 6364–6369.

Reisberg B, Auer SR, Monteiro I, Boksay I, Sclan SG. (1996). *Behavioral disturbances of dementia: an overview of phenomenology and methodologic concerns*. Int Psychogeriatr 2, 169-180.

Reyes PF, Deems DA, Suarez MG. (1993). *Olfactory-related changes in Alzheimer's disease: a quantitative neuropathologic study*. Brain Res Bull 32, 1–5.

Roberson ED, Scarce-Levie K, Palop JJ, Yan F, Cheng IH, Wu T, Gerstein H, Yu GQ, Mucke L. (2007). *Reducing endogenous tau ameliorates amyloid β induced deficits in an Alzheimer's disease mouse model*. Science 316, 750–754.

Rocher AB, Crimins JL, Amatrudo JM, Kinson MS, Todd-Brown MA, Lewis J and Luebke JI. (2010). *Structural and functional changes in tau mutant mice neurons are not linked to the presence of NFTs*. Exp. Neurol 223, 385–393

Rojas-Libano D, Kay LM. (2008). *Olfactory system gamma oscillations: the physiological dissection of a cognitive neural system*. Cogn Neurodyn 2, 179-194.

Rowan MJ, Klyubin I, Wang Q, Anwyl R. (2004). *Mechanisms of the inhibitory effects of amyloid beta-protein on synaptic plasticity*. Exp Gerontol 39, 1661-1667.

Rowan MJ, Klyubin I, Wang Q, Hu NW, Anwyl R. (2007). *Synaptic memory mechanisms: Alzheimer's disease amyloid beta-peptide-induced dysfunction*. Biochem Soc Trans 35, 1219-1223.

Ryves WJ y Harwood AJ. (2003). *The interaction of glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) with the cell cycle*. Prog Cell Cycle Res 5, 489-495.

Saghatelian A, Carleton A, Lagier S, de Chevigny A, Lledo PM. (2003). *Local neurons play key roles in the mammalian olfactory bulb*. J Physiol Paris 97, 517-528.

Salgado-Puga K, Pena-Ortega F. (2015). *Cellular and network mechanisms underlying memory impairment induced by amyloid β protein*. Protein Pept Lett. 22, 303-21.

Salmon DP. (2012). *Neuropsychological features of mild cognitive impairment and preclinical Alzheimer's disease*. Curr Top Behav Neurosci 10, 187-212.

Sanchez C, Perez M, y Ávila J. (2000). *GSK3beta-mediated phosphorylation of the microtubule-associated protein 2C(MAP2C) prevents microtubule bundling*. Eur. J. Cell Biol. 79, 252–260.

- Selkoe DJ. (1993). *Physiological production of the beta-amyloid protein and the mechanism of Alzheimer's disease*. Trends Neurosci 16, 403-409.
- Selkoe DJ. (1997). *Alzheimer's disease: genotypes, phenotypes, and treatments*. Science 275, 630-631.
- Selkoe DJ. (1999). *Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease*. Nature 399, A23-31.
- Selkoe DJ. (2001). *Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy*. Physiol Rev 81, 741-766.
- Selkoe DJ. (2001). *Clearing the brain's amyloid cobwebs*. Neuron 32, 177-180.
- Sergeant N, Bretteville A, Hamdane M, Caillet-Boudin ML, Grognet P, Bombois S, Blum D, Delacourte A, Pasquier F, Vanmechelen E, Schraen-Maschke S, Buée L. (2008). *Biochemistry of tau in Alzheimer's disease and related neurological disorders*. Expert Rev. Proteomics 5, 207–224.
- Shankar GM, Bloodgood BZ, Townsend M, Walsh DM, Selkoe DJ, Sabatini BL. (2007). *Natural oligomers of the Alzheimer amyloid-beta protein induce reversible synapse loss by modulating an NMDA-type glutamate receptor-dependent signaling pathway*. J Neurosci 27, 2866-2875.
- Shaw S, Bencherif M, Marrero MB. (2002). *Janus kinase 2, an early target of alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor-mediated neuroprotection against Aβ(1-42) amyloid*. J Biol Chem 277, 44920-44924.
- Shepherd GM. (1972). *Synaptic organization of the mammalian olfactory bulb*. Physiol Rev 52, 864-917.
- Shepherd GM, Chen W y Greer C. (2004). *Olfactory bulb en the synaptic organization of the Brain*. 5ed. editor by Gordon M. Shepherd. Oxford University press.
- Shimohama S y T. Kihara (2001). *Nicotinic receptor-mediated protection against beta-amyloid neurotoxicity*. Biol Psychiatry 49, 233-239.
- Shipton O, Leitz JR, Dworzak J Acton C, Tunbridge E, Denk F, Dawson H, Vitek M, Wade-Martins R, Paulsen O, Vargas-Caballero M. (2011). *Tau protein is required for amyloid β-induced impairment of hippocampal longterm potentiation*. The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience 31, 1688-92.
- Shin S, Wolgamott L, Wolgamott L, Yu Y, Blenis J, Yoon SO. (2011). *Glycogen synthase kinase (GSK)-3 promotes p70 ribosomal protein S6 kinase (p70S6K) activity and cell proliferation*. Proc Natl Acad Sci 108, 1204-1213.

Slachevsky A, Fuentes P, Javet L y Alegría P. (2007). *Enfermedad de Alzheimer y otras demencias, Guía para familiares y cuidadores*. 1era ed. Edit. LOM Santiago de Chile.

Small B.J, Gagnon E, Robinson B. (2007). *Early identification of cognitive deficits: preclinical Alzheimer's disease and mild cognitive impairment*. *Geriatrics* 62, 19-23.

Snyder EM, Nong Y, Almeida CG, Paul S, Moran T, Choi EY, Nairn AC, Salter MW, Lombroso PJ, Gouras GK, Greengard P. (2005). *Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid-beta*. *Nat Neurosci* 8, 1051-1058.

Spaan PE, Raaijmakers JG, Jonker C. (2003). *Alzheimer's disease versus normal ageing: a review of the efficiency of clinical and experimental memory measures*. *J Clin Exp Neuropsychol* 25, 216-233.

Spillantini MG, Goedert M. (2013). *Tau pathology and neurodegeneration*. *Lancet Neuro* 12, 609–22.

Stakic J, Suchanek JM, Ziegler GP, Griff ER (2011). *The source of spontaneous activity in the main olfactory bulb of the rat*. *PLoS One* 6, 23990.

Stern Y, Tang MX, Albert MS, Brandt J, Jacobs DM, Bell K, Marder K, Sano M, Devanand D, Albert SM, Bylsma F, Tsai WY. (1997). *Predicting time to nursing home care and death in individuals with Alzheimer disease*. *JAMA* 277, 806-812.

Stoothoff WH and Johnson GV. (2005). *Tau phosphorylation: physiological and pathological consequences*. *Biochim. Biophys. Acta* 1739, 280–297.

Subaiea GM, Adwana LI, Ahmedb AH, Stevens KE , Zawiaa NH, (2013). *Short-term treatment with tolfenamic acid improves cognitive functions in Alzheimer's disease mice*. *Neurobiology of Aging*. 2421-2430.

Susen K. y Blochl A. (2005). *Low concentrations of aggregated beta-amyloid induce neurite formation via the neurotrophin receptor p75*. *J Mol Med* 83, 720-735.

Tai HC, Serrano-Pozo A, Hashimoto T, Frosch MP, Spires-Jones TL, Hyman BT. (2012). *The synaptic accumulation of hyperphosphorylated tau oligomers in Alzheimer disease is associated with dysfunction of the ubiquitin-proteasome system*. *Am J Pathol* 181, 1426–1435.

Taipale J. y Beachy PA. (2001). *The Hedgehog and Wnt signalling pathways in cancer*. *Nature* 411, 349-354.

Takashima A, Noguchi K, Sato K, Hoshino T, Imahori K. (1993). *Tau protein kinase I is essential for amyloid beta-protein-induced neurotoxicity*. *Proc Natl Acad Sci* 90, 7789-7793.

Takashima A, Noguchi K, Michel G, Mercken M, Hoshi M, Ishiguro K, Imahori K. (1996).

Exposure of rat hippocampal neurons to amyloid beta peptide (25-35) induces the inactivation of phosphatidyl inositol-3 kinase and the activation of tau protein kinase I/glycogen synthase kinase-3 beta. Neurosci Lett 203, 33-36.

Taler V and Phillips NA. (2008). *Language performance in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: a comparative review.* J Clin Exp Neuropsychol 30, 501-556.

Tanzi RE, Kovacs DM, Kim TW, Moir RD, Guenette SY, Wasco W. (1996). *The gene defects responsible for familial Alzheimer's disease.* Neurobiol Dis 3, 159-168.

Texido L, Martin-Satue M, Alberdi E, Solsona C, Matute C. (2011). *Amyloid beta peptide oligomers directly activate NMDA receptors.* Cell Calcium 49, 184-190.

Thomas GM, Frame S, Goedert M, Nathke I, Polakis P, Chen P. (1999). *A GSK3-binding peptide from FRAT1 selectively inhibits the GSK3-catalysed phosphorylation of axin and beta-catenin.* FEBS Lett 458, 247-251.

Thompson MD, Knee K, Golden CJ. (1998). *Olfaction in persons with Alzheimer's disease.* Neuropsychol Rev 8, 11-23.

Tolnay M y Probst A. (2003). *The neuropathological spectrum of neurodegenerative tauopathies.* IUBMB Life 55, 299-305.

Townsend M, Shankar GM, Mehta T, Walsh DM, Selkoe DJ. (2006). *Effects of secreted oligomers of amyloid beta-protein on hippocampal synaptic plasticity: a potent role for trimers.* J Physiol 572, 477-492.

Townsend M, Mehta T, Selkoe DJ. (2007). *Soluble Abeta inhibits specific signal transduction cascades common to the insulin receptor pathway.* J Biol Chem 282, 33305-33312.

Tsukamoto E, Hashimoto Y, Kanekura K, Niikura T, Aiso S, Nishimoto I. (2003). *Characterization of the toxic mechanism triggered by Alzheimer's amyloid-beta peptides via p75 neurotrophin receptor in neuronal hybrid cells.* J Neurosci Res 73, 627-636.

Urban NN, Arevian AC. (2009). *Computing with dendrodendritic synapses in the olfactory bulb.* Ann N Y Acad Sci 1170, 264-269.

Vargas-Barroso V, Ordaz-Sánchez B, Peña-Ortega F. y Larriva-Sahd JA. (2016). *Electrophysiological Evidence for a Direct Link between the Main and Accessory Olfactory Bulbs in the Adult Rat.* Frontiers in Neuroscience 9, 1-14.

Verdier Y, Zarandi M, Penke B. (2004). *Amyloid beta-peptide interactions with neuronal and glial cell plasma membrane: binding sites and implications for Alzheimer's disease.* J Pept Sci 10, 229-248.

Verdier Y y Penke B. (2004). *Binding sites of amyloid beta-peptide in cell plasma*

membrane and implications for Alzheimer's disease. Curr Protein Pept Sci 5, 19-31.

Verret L, Mann EO, Hang GB, Barth AM, Cobos I, Ho K, Devidze N, Masliah E, Kreitzer AC, Mody I, Mucke L, Palop JJ. (2012). *Inhibitory interneuron deficit links altered network activity and cognitive dysfunction in Alzheimer model.* Cell 149, 708–721.

Villette V, Poindessous-Jazat F, Simon A, Léna C, Roullot E, Bellessort B, Epelbaum J, Dutar P, Stéphan A. (2010). *Decreased rhythmic GABAergic septal activity and memory-associated theta oscillations after hippocampal amyloid-beta pathology in the rat.* J Neurosci 30, 10991-11003.

Vossel KA, Xu CJ, Fomenko V, Miyamoto T, Suberbielle E, Knox JA, Ho K, Kim DH, Yu GQ and Mucke L. (2015). *Tau reduction prevents A β induced axonal transport deficits by blocking activation of GSK3.* The Journal of Cell Biology 419-433.

Wachowiak M, Shipley MT. (2006). *Coding and synaptic processing of sensory information in the glomerular layer of the olfactory bulb.* Semin Cell Dev Biol 17, 411-423.

Wang HY, Lee DH, D'Andrea MR, Peterson PA, Shank RP, Reitz AB. (2000a). *Beta-Amyloid (1-42) binds to alpha7 nicotinic acetylcholine receptor with high affinity. Implications for Alzheimer's disease pathology.* J Biol Chem 275, 5626-5632.

Wang HY, Lee DH, Davis CB, Shank RP. (2000b). *Amyloid peptide Abeta (1-42) binds selectively and with picomolar affinity to alpha7 nicotinic acetylcholine receptors.* J Neurochem 75, 1155-1161.

Wang Q. (2003). *The role of Ab-peptide on spatial memory, EEG, auditory evoked potentials and nicotinic cholinergic receptors in a/p transgenic mice.* Tesis doctoral: Departamento de neurología. Universidad de Kuopio.

Wang Q, Wu J, Rowan MJ, Anwyl R. (2005). *Beta-amyloid inhibition of long-term potentiation is mediated via tumor necrosis factor.* Eur J Neurosci 22, 2827-2832.

Wang JZ y Liu F. (2008). *Microtubule-associated protein tau in development, degeneration and protection of neurons.* Prog Neurobiol 85, 148-175.

Walsh DM, Klyubin I, Fadeeva JV, Cullen WK, Anwyl R, Wolfe MS, Rowan MJ, Selkoe DJ. (2002). *Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo.* Nature 416, 535-539.

Warner MD, Peabody CA, Flattery JJ, Tinklenberg JR. (1986). *Olfactory deficits and Alzheimer's disease.* Biol Psychiatry 21, 116-118.

Wesson DW, Levy E, Nixon RA, Wilson DA. (2010a). *Olfactory dysfunction correlates with amyloid-beta burden in an Alzheimer's disease mouse model.* J Neurosci 30, 505-514.

Wesson DW, Wilson DA, Nixon RA. (2010b). *Should olfactory dysfunction be used as a*

biomarker of Alzheimer's disease? Expert Rev Neurother 10, 633-635.

Wesson DW, Borkowski AH, Landreth GE, Nixon RA, Levy E, Wilson DA, (2011). *Sensory network dysfunction, behavioral impairments, and their reversibility in an Alzheimer's b-amyloidosis mouse model.* J. Neurosci. 31, 15962e15971.

Wimo A, Winblad B, Aguero-Torres H, von Strauss E. (2003). *The magnitude of dementia occurrence in the world.* Alzheimer Dis Assoc Disord 17, 63-67.

Wood JG, Mirra SS, Pollock NJ, Binder LI. (1986). *Neurofibrillary tangles of Alzheimer disease share antigenic determinants with the axonal microtubule-associated protein tau.* Proc. Natl. Acad. Sci. 83, 4040-4043.

Woodgett JR. (1990). *Molecular cloning and expression of glycogen synthase kinase-3/factor A.* EMBO J 9, 2431-2438.

Xie L, Helmerhorst E, Taddei K, Plewright B, Van Bronswijk W, Martins R. (2002). *Alzheimer's beta-amyloid peptides compete for insulin binding to the insulin receptor.* J Neurosci 22, RC221.

Yamaguchi H, Ishiguro K, Uchida T, Takashima A, Lemere CA and Mahori K. (1996). *Preferential labeling of Alzheimer neurofibrillary tangles with antisera for tau protein kinase (TPK) I/glycogen synthase kinase-3 beta and cyclin-dependent kinase 5, a component of TPK II.* Acta Neuropathol 92, 232-241.

Yang M., y Crawley JN. (2009). *Simple Behavioral Assessment of Mouse Olfaction.* En J. N. Crawley, C. R. Gerfen, M. A. Rogawski, D. R. Sibley, P. Skolnick, y S. Wray (Eds.), Current Protocols in Neuroscience. Hoboken, NJ, USA: John Wiley y Sons, Inc. Recuperado <http://doi.wiley.com/10.1002/0471142301.ns0824s48>.

Yun SH, Gamkrelidze G, Stine WB, Sullivan PM, Pasternak JF, Ladu MJ, Trommer BL. (2006). *Amyloid-beta1-42 reduces neuronal excitability in mouse dentate gyrus.* Neurosci Lett 403, 162-165.

Zelko IN, Mariani TJ, y Folz RJ. (2002). *Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the cuzn-sod (sod1), mn-sod (sod2), and ec-sod (sod3) gene structures, evolution, and expression.* Free Radical Biology & Medicine, 33, 337-349.

Zhang Y, Hong Y, Bounhar Y, Blacker M, Roucou X, Tounekti O, Vereker E, Bowers WJ, Federoff HJ, Goodyer CG, LeBlanc A. (2003). *p75 neurotrophin receptor protects primary cultures of human neurons against extracellular amyloid beta peptide cytotoxicity.* J Neurosci 23, 7385-7394.

Zhang YW, Thompson R, Zhang H, Xu H. (2011). *APP processing in Alzheimer's disease.* Mol Brain 4, 3.

Zhao WQ, De Felice FG, Fernandez S, Chen H, Lambert MP, Quon MJ, Krafft GA, Klein

WL. (2008). *Amyloid beta oligomers induce impairment of neuronal insulin receptors*. FASEB J 22, 246-260.

Zúñiga E y Vega D. (2005). *Envejecimiento de la población de México reto del siglo XXI* CONAPO

11. LISTAS DE FIGURAS Y TABLAS

Tabla 1. RESUMEN DE TUS TRATAMIENTOS.....	38
Tabla 2. OLIGONUCLEÓTIDOS USADOS EN EL qPCR.....	41
Tabla 3. RESUMEN DEL PORCETAJE DE CAMBIO EN LA POTENCIA DE LA ACTIVIDAD ESPONTÁNEA DEL BULBO OLFATORIO.....	57
Fig 1. PROCESAMIENTO DE LA PROTEÍNA PRECURSORA DE BETA AMILOIDE APP.....	14
Fig 2. ESTRUCTURA DE LA PROTEÍNA TAU.....	24
Fig 3. SEÑALIZACIÓN ACTIVADA POR LA BETA AMILOIDE.....	34
Fig 4. LA ACTIVIDAD ESPONTÁNEA DE LA CAPA GRANULAR DEL BOP SE MANTIENE ESTABLE A TRAVÉS DEL TIEMPO DE REGISTRO.....	46
Fig 5. LA A β DISMINUYE LA ACTIVIDAD ESPONTÁNEA DE LA CAPA GRANULAR DEL BOP.....	48
Fig 6. EFECTO DE LA APLICACIÓN AGUDA DE CLORURO DE LITIO (LiCl, INHIBIDOR INESPECÍFICO DE GSK3) SOBRE EL DAÑO INDUCIDO POR LA A β EN LA ACTIVIDAD ESPONTÁNEA DE LA CAPA GRANULAR DEL BOP.....	50
Fig 7. EFECTO DE LA APLICACIÓN DE SB216763 (INHIBIDOR SELECTIVO DE GSK3) SOBRE EL DAÑO INDUCIDO POR LA A β EN LA ACTIVIDAD ESPONTÁNEA DE LA CAPA GRANULAR DEL BOP.....	52
Fig 8. EFECTO DE LA APLICACIÓN DE ÁCIDO TOLFENÁMICO SOBRE EL DAÑO INDUCIDO POR LA A β EN LA ACTIVIDAD ESPONTÁNEA DE LA CAPA GRANULAR DEL BOP.....	54
Fig 9. EFECTO DE LA INYECCIÓN INTRABULBAR DEL shARN CONTRA EL TRANSCRITO DE TAU SOBRE LA ACTIVIDAD ESPONTÁNEA DE LA CAPA GRANULAR DEL BOP EN PRESENCIA DE LA PROTEÍNA A β	53

**Fig 10. EVALUACIÓN DE LA OLFACCIÓN DE LOS ANIMALES TRATADOS
CON EL ÁCIDO TOLFENÁMICO, LA PROTEÍNA A β Y EL shARN PARA
EL TRANSCRITO DE TAU.....61**

12. LISTA DE ABREVIATURAS

Σ	Sumatoria
Δ	Cambio
AE	Enfermedad de Alzh eimer
A β	Proteína Beta Amiloide
Ach	Acetil Colina
AMPA	A-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propionato
AMPA	Receptor a AMPA
AON	Núcleo Anterior Olfatorio
ApoE	Apolipoproteína E
APP	Proteína Precursora del Amiloide (por sus siglas en inglés)
BOA	Bulbo Olfatorio Accesorio
BOP	Bulbo Olfatorio Principal
Ca ⁺²	Ion Calcio
EA	Enfermedad de Alzheimer
EEG	Electroencefalograma
FTD	Demencia Frontotemporal (por sus siglas en inglés)
FTDP-17	Demencia Frontotemporal con Parkinsonismo-17 (por sus siglas en inglés)
GABA	Ácido γ -aminobutírico (por sus siglas en inglés)
GSK3	Cinasa de la Glucógeno Sintasa (por sus siglas en inglés)
hAPP	Proteína Precursora de Beta Amiloide humana (por sus siglas en inglés)
HFIP	1,1,1,3,3,3, hexafloruro-2-propanol

Hz	Hertz
i.p.	Intraperitoneal
IR	Receptor de Insulina (por sus siglas en inglés)
ISF	Líquido Intersticial (por sus siglas en inglés)
kDa	Kilodaltones
Kg	kilogramos
LCRA	Líquido Cefalorraquídeo Artificial
LCR	Líquido Cefalorraquídeo
LiCl	Cloruro de Litio
LTD	Depresión de Largo Plazo (por sus siglas en inglés)
LTP	Potenciación de Largo Plazo (por sus siglas en inglés)
MAPs	Proteínas Asociadas a Microtúbulos (por sus siglas en inglés)
min	Minutos
mg	Miligramos
mm	Milímetros
mM	Milimolar
μ M	Micro molar
μ s	Microsegundos
μ V	Micro volts
nAChR	Receptor Nicotínico (por sus siglas en inglés)
nL	Nanolitros
nM	Nano molar
NMDA	N-metil D-aspartato

NMDAR	Receptor a NMDA
NRT	Receptor de Neurotrofinas (por sus siglas en inglés)
NTFs	Marañas Neurofibrilares (por sus siglas en inglés)
OE	Epitelio Olfatorio (por sus siglas en inglés)
PHFs	Filamentos Helicoidales Pareados (por sus siglas en inglés)
PS1	Presenilina 1
PS2	Presenilina 2
RNS	Especies Reactivas de Nitrógeno (por sus siglas en inglés)
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno (por sus siglas en inglés)
s	Segundos
TA	Ácido Tolfenámico (por sus siglas en inglés)
TNF-R	Receptor del Factor de Necrosis Tumoral (por sus siglas en inglés)
TRF	Transformada Rápida de Fourier
VNO	Órgano Vomeronasal (por sus siglas en inglés)