



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

Disfunción colinérgica y catecolaminérgica inducida por beta amiloide en un modelo para la enfermedad de Alzheimer.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MÉDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA

P R E S E N T A:

Carlos Ledesma Alonso

Asesor de Tesis :

Dra. Perla del Rocío Moreno Castilla

CUAUTITLAN IZCALLI, ESTADO DE MEXICO, 2017.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DATOS DEL JURADO

Categoría: *Presidente*

Antigüedad: *01/01/1977*

Nombre: *M.C. Jorge Muñoz Muñoz*

Categoría: *Vocal*

Antigüedad: *09/15/1978*

Nombre: *M.C. Juana Ortega Mondragón*

Categoría: *Secretario*

Antigüedad: *09/01/2008*

Nombre: *Dra. Perla del Rocío Moreno Castilla*

Categoría: *1er Suplente*

Antigüedad: *07/09/1983*

Nombre: *M. C. Juan Carlos Valladares de la Cruz*

Categoría: *2do. Suplente*

Antigüedad: *05/01/1990*

Nombre: *M.C. Crisóforo Mercado Márquez*

*Datos de la Tesis.

- Julio 2017
- 50 páginas

Agradecimientos académicos:

Agradezco mucho al Dr. Federico Bermúdez Rattoni, por permitirme ser parte de su laboratorio, y proporcionarme una beca de ayudante de investigador SNI nivel III y así mismo agradezco mucho a la Dra. Perla del Rocío Moreno Castilla por ser mi tutora en muchos aspectos, por su paciencia y ayuda que me brindó a lo largo de todo este trabajo de investigación, a mis compañeros de laboratorio Jorge Eduardo Hernández Ortiz y Cintia Velázquez Delgado porque de alguna manera participaron en el proceso. Al Dr. Miguel Tapia de la unidad de Microscopía de Ciencias Biomédicas por instruirme a usar el equipo para realizar estereología.

También agradezco al personal académico del Bioterio del Instituto de Fisiología Celular: MVZ Héctor Malagón Rivero, MVZ Claudia Rivero Cerecedo y M. en I.B.B Gabriela Xochitl Ayala Méndez por la reproducción y cuidado de los ratones utilizados para los experimentos de la presente tesis.

Agradecimientos personales:

Quiero agradecer a todo el personal del laboratorio, por la amistad que me ofrecieron y los buenos momentos que pasamos juntos.

Pero sobre todo, quiero agradecer con creces a mi madre, por apoyarme en demasía durante toda mi vida, ya que sin ella, no habría sido posible realizar este trabajo.

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Neurobiología del aprendizaje y la memoria a cargo del Dr. Federico Bermúdez Rattoni, en el departamento de Neurociencia Cognitiva de la División de Neurociencias del Instituto de Fisiología Celular (IFC), UNAM. Apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) CB 250870, Fronteras de la Ciencia 474 y por el Programa de Apoyos a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIT-UNAM) IN208616.

Abreviaturas:

3xTg- AD. *Modelo triple transgénico para la enfermedad de Alzheimer*

5-HT. *Cinco Hidroxitriptamina o Serotonina.*

ACe. *Acetilcolina esterasa*

APP. *Proteína precursora de amiloide*

βA. *Beta amiloide*

CA1. *Cuerno de Amón 1*

ChAT. *Colina Acetiltransferasa*

CICUAL. *Comité Interno para el Cuidado y uso de los Animales de Laboratorio*

CCP. *Corteza Cingulada Posterior*

DAPI. *4',6-diamino-2-fenilindol*

EA. *Enfermedad de Alzheimer*

EP. *Enfermedad de Parkinson*

HCA. *Hipótesis de la cascada amiloide*

LC. *Locus Coeruleus*

LTP. *Long Term Potentiation (Potenciación a largo plazo)*

LTD. *Long Term Depression (Depresión a largo plazo)*

PFA. *Paraformaldehído.*

PS1. *Presenilina 1*

PS2. *Presenilina 2*

SNC. *Sistema Nervioso Central*

TH. *Tirosina Hidroxilasa*

Índice:

1. Resumen.....	2
2. Introducción.....	3
2.1. Generalidades de la Enfermedad de Alzheimer.....	3
2.2. Características histopatológicas de la EA.....	4
2.3. Etiología de la EA.....	5
2.4. Proteólisis de β -Amiloide.....	5
2.5. Proteína Tau.....	7
2.6. Modelos experimentales de la EA.....	8
2.6.1. Modelos transgénicos.....	8
2.6.2. Modelos no transgénicos.....	10
3. Antecedentes.....	11
3.1. Alteraciones neuroquímicas en la EA.....	12
3.2. Hipótesis colinérgica de la EA.....	13
3.3. Alteraciones en la neurotransmisión dopaminérgica.....	14
3.4. Alteraciones en la neurotransmisión noradrenérgica.....	15
4. Planteamiento del problema.....	16
5. Objetivos.....	17
5.1. Objetivos particulares.....	17
6. Hipótesis.	17
7. Metodología Experimental.....	18
7.1. Animales.....	18
7.2. Cirugía estereotáxica.....	18
7.3. Perfusión y eutanasia.....	19
7.4. Seccionar cerebros.....	20
7.5. Inmunohistoquímica contra ChAT y TH.....	20
7.6. Cuantificación con estereología.....	21
8. Resultados.....	25
9. Discusión.....	31
10. Conclusiones.....	33
11. Referencias.....	34

1. Resumen

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la demencia más común de todas, y representa un problema muy importante de salud pública. Por ello su estudio a nivel estructural y celular es imprescindible, si no para detener su patogenia, sí para poder aminorar su progresión. En este trabajo se realizó una investigación acerca de dos de los sistemas neuroquímicos comprometidos en diferentes estadios de la EA. El sistema colinérgico participa en la cognición y el aprendizaje, así como el sistema catecolaminérgico. Se sabe que en la EA hay alteraciones de distintos neurotransmisores como la acetilcolina, no obstante, no se sabe con exactitud el papel de la dopamina en la EA. En este trabajo de investigación se compararon los dos sistemas de neurotransmisores mencionados anteriormente, en dos zonas distintas, el hipocampo y la corteza cingulada posterior, ambos afectados en la EA. Se comprobó en un modelo esporádico de la EA que al administrarle beta amiloide en el hipocampo y en la corteza cingulada posterior, el sistema catecolaminérgico es más sensible al efecto negativo de dicho péptido que el sistema colinérgico.

2. Introducción.

2.1. Generalidades de la Enfermedad de Alzheimer.

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la demencia más frecuente y cerca de 115 millones de personas la padecen, de los cuales más del 60% son ancianos (Prince *et al.*; 2013). Entre los primeros síntomas, los pacientes muestran deterioro de la memoria reciente y la atención, seguido por el deterioro de las habilidades del lenguaje, la orientación visuoespacial, el pensamiento abstracto y el juicio (Purves; 2011).

La EA se ha clasificado en dos tipos según su origen: la esporádica, de causa hasta ahora desconocida y la familiar que se hereda de forma autosómica dominante (Coronas-Samano *et al.*; 2016). En ambos casos, los análisis post-mortem de los cerebros de los pacientes con la EA muestran neurodegeneración extensiva y pérdida de masa cerebral (figura1).



Figura 1. Dos fotografías de cerebros, el de la imagen superior pertenecía a un individuo normal, y el de la imagen inferior al de un individuo con la EA. Se aprecia una pérdida de sustancia gris en comparación al cerebro normal. Imagen modificada del artículo (Bird 2008).

A la fecha, la EA no tiene cura o tratamiento eficiente y los tratamientos actualmente aprobados se enfocan en disminuir el deterioro cognitivo. Existen cuatro fármacos aprobados por la FDA (Food and Drug Administration), de los

cuales tres son inhibidores de la acetilcolinesterasa (ACe), enzima encargada de degradar al neurotransmisor acetilcolina (ACh), y por ende incrementan su cantidad. La memantina, por otro lado, regula la actividad del glutamato al antagonizar a sus receptores. Sin embargo, tienen efectividad limitada por un corto periodo de tiempo (Purves; 2008).

2.2. Características histopatológicas de la EA.

La histopatología de la enfermedad presenta tres características principales: colecciones de filamentos de citoesqueleto intraneuronales denominados ovillos o marañas neurofibrilares formados por la proteína Tau, depósitos extra e intracelulares de una proteína amiloidea, llamada beta-amiloide (β A), en forma placas y una pérdida difusa de las neuronas (Purves; 2008).

Se han descrito dos lesiones bien definidas: neuronas difusas con placas del péptido β A y marañas neurofibrilares compuestas por la proteína Tau hiperfosforilada (Haass and Selkoe; 2007). Estas lesiones pueden observarse desde etapas tempranas de la EA como se muestra en la figura 2.

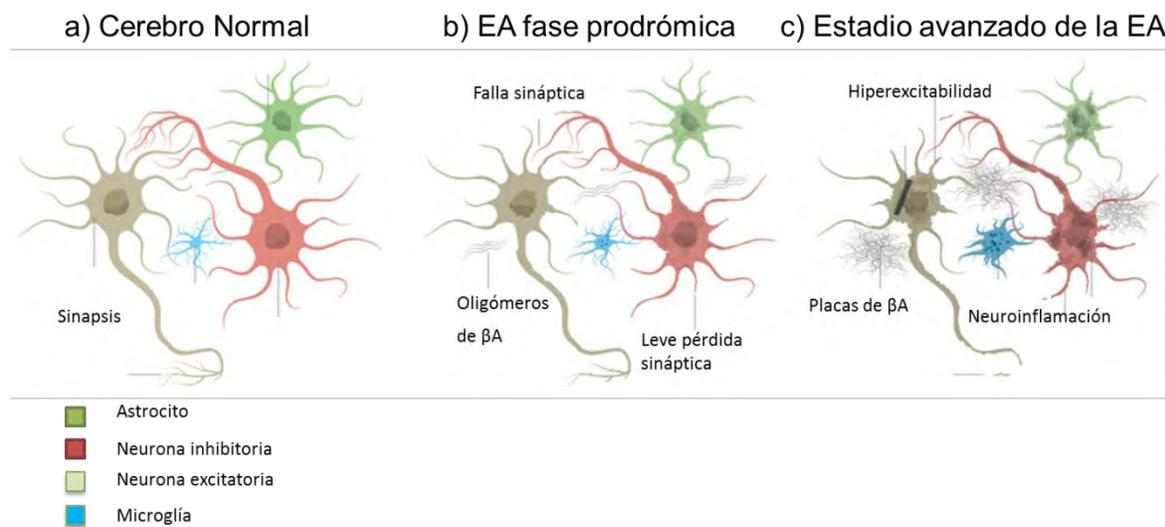


Figura 2. A) Neuronas y células gliales se comunican a través de las sinápsis. B) En este estadio de la enfermedad, es cuando se empiezan a formar oligómeros de β A y a pasar al espacio extracelular, existe una ligera disfunción sináptica. C) En la fase más avanzada de la EA, ya se forma placas de β A, marañas neurofibrilares de la proteína Tau, una gran disfunción sináptica y

procesos de neuroinflamación como astrogliosis. (Imagen modificada del artículo Canter, Penney, and Tsai; 2016).

2.3. Etiología de la EA.

Ya sea una edad avanzada, por trastornos alimenticios, sustancias tóxicas o incluso traumatismos cerebrales, la etiología de la EA es causada por la influencia de más de un factor y a la fecha no se ha determinado exactamente su etiología.

La hipótesis de la cascada amiloide de la EA (HCA) es la hipótesis más estudiada de todas, y se basa en el metabolismo del péptido β A, desde su proteólisis hasta su proceso de limpieza. La HCA propone que la producción exacerbada y acumulación del péptido β A es la causa de una serie de alteraciones en cascada que conducen a la falla sináptica, destrucción dendrítica y muerte neuronal, acumulación de Tau hiperfosforilada (Karran and De Strooper; 2016). Lo anterior se sostiene a partir de diversas evidencias que muestran que el β A causa falla sináptica de manera directa y la formación de marañas neurofibrilares de Tau. Sin embargo, aún es debatible si es la causa definitiva de la EA, debido a que se han reportado pacientes con demencia tipo Alzheimer que no tienen agregados del β A y personas sanas que sí tienen dichos agregados.

2.4. Proteólisis beta amiloide (β A)

La proteína β A está asociada y es considerada por muchos la causa de la EA (Leissring *et al.* 2003; Walsh and Selkoe; 2007), y es por esta razón que en esto se basan para tratamientos terapéuticos (Bennett *et al.*; 2006).

Esta proteína de 39 a 43 aminoácidos tiene la peculiar habilidad para agregarse y oligomerizarse en lo que se denominan placas seniles (Haass and Selkoe; 2007). Una deposición de placas puede preceder a un deterioro cognitivo por una o dos décadas, y una acumulación de fibrillas esencialmente mesetas pueden estar de manifiesto, incluso antes de que aparezcan los síntomas (Wilkins and Swerdlow; 2016).

La producción de β A se lleva a cabo a partir de la proteólisis de la llamada Proteína Precursora Amiloide (APP), que es codificada por un gen localizado en

el cromosoma 21 (Walsh and Selkoe; 2007), mismo cromosoma cuya trisomía causa el síndrome de Down. Aunque la función principal de la APP no se ha comprendido por completo, es crucial para la plasticidad neuronal y la formación de nuevas sinapsis (Haass and Selkoe; 2007). Por lo tanto, tiene un rol fisiológico indispensable para la integridad del sistema nervioso.

La proteólisis de βA se lleva a cabo de dos formas distintas: la vía no amiloidogénica y la vía amiloidogénica. En la vía no amiloidogénica, una gran parte de la APP se corta en la membrana plasmática por una enzima, la α -secretasa, para ser después cortada por otra enzima la γ -secretasa, lo que da como resultado un péptido de unos 3 kDa y un ectodominio de APP intracelular (Habib, Sawmiller, and Tan; 2016). En la vía amiloidogénica, la APP no cortada que restaba, es cortada por otra enzima, β -secretasa, en el lisosoma, para después ser cortada por la γ -secretasa que produce los nocivos péptidos βA_{40-42} (Haass and Selkoe; 2007). En la figura 3 se observa una ilustración acerca de las dos vías por la cual se realiza la proteólisis de βA y las enzimas que participan.

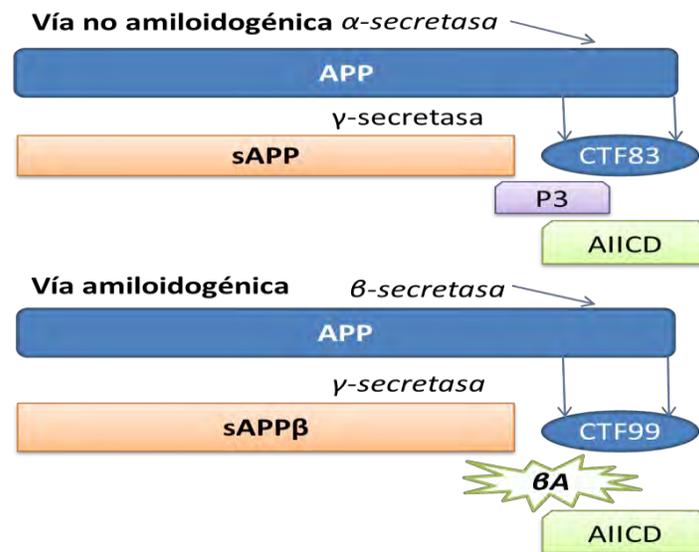


Figura 3. Proteólisis de βA . La vía no amiloidogénica comienza con la acción de la α -secretasa en la proteína APP, dando como resultado un ectodominio (sAPP α) y un límite de membrana (CTF83). En la vía amiloidogénica, cambian las enzimas que cortan la proteína APP, primero comienza con la β -secretasa y forma el ectodominio y el límite membranaral que se muestra en la figura, solo que este al ser cortado por la enzima γ -secretasa, forma el péptido βA . (Imagen modificada del artículo Wilkins and Swerdlow; 2016).

2.5. Proteína Tau

La proteína Tau es el microtúbulo más asociado al crecimiento y desarrollo natural de las neuronas (Kempf *et al.*; 1996), y una de sus funciones principales es la de estabilizar y mantener el ensamblaje de los microtúbulos en los axones de las neuronas (Alonso *et al.*; 1994), es decir, al igual que el péptido beta amiloide, la proteína Tau tiene una participación relevante en la plasticidad neuronal.

No obstante, en su estado patológico se forman unas estructuras amorfas denominadas marañas neurofibrilares, causantes de una disfunción.

Estas marañas neurofibrilares son filamentos helicoidales de unos 12 kDa de la proteína Tau lo que genera alteraciones cognitivas (Wischik *et al.*; 2015). Numerosos estudios han confirmado un vínculo entre la disposición en el cerebro de estas marañas neurofibrilares con la demencia causada por la EA.

En el cerebro humano, la proteína Tau se puede hallar en 6 isoformas, resultado del corte en el gen Tau (Gauthier *et al.*; 2016). Tau es una proteína fosforilada en condiciones normales, y su función es el andamiaje, empero, es cuando ocurre una hiperfosforilación cuando empieza a hacerse evidente la disfunción de esta proteína (Iqbal *et al.*; 1994).

Esta es la otra característica histopatológica encontrada en pacientes con la EA, que como se ha visto también conlleva a déficits cognitivos. En la figura 4 se puede observar la presencia de la proteína Tau en el hipocampo.

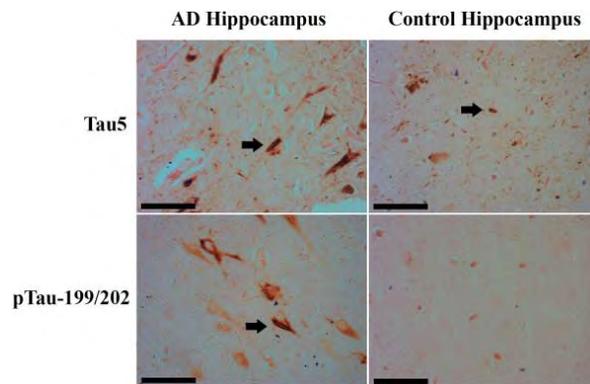


Figura 4. Inmunohistoquímica para proteína Tau. Inmunohistoquímica de un cerebro embebido en parafina, cuyas secciones tienen anticuerpos contra Tau5 y pTau-199/202. (Figura modificada del artículo Spears *et al.*; 2014).

2.6. Modelos experimentales de la EA

El uso de animales de laboratorio resulta imprescindible junto con la introducción de diferentes modelos experimentales (Van Dam and De Deyn; 2017). Los primeros modelos de ratones transgénicos para reproducir las lesiones microscópicas de la EA expresaban el gen APP que contenía las mutaciones para generar la enfermedad en etapas tempranas (McGowan, Eriksen, and Hutton; 2006). No obstante, existe el uso de modelos no transgénicos, por ejemplo, inyectando directamente el péptido beta amiloide en diferentes regiones del cerebro.

2.6.1 Modelos transgénicos

El uso de las mutaciones de los genes como el del APP, y presenilina 1 (PS1), en ratones resulta muy útil para replicar la EA, ya que presentan las características histopatológicas de la enfermedad, e incluso estos ratones muestran neuroinflamación (Wong *et al.*; 2002, Kitazawa, Medeiros, and LaFerla; 2012).

En la tabla 1, se encuentran algunos modelos de ratones transgénicos para estudiar la fisiopatología de la EA.

Tabla 1. Modelos transgénicos para la EA. (Tabla modificada del artículo de McGowan, Eriksen, and Hutton; 2006)

Modelo	Breve descripción de la mutación
Transgénico	
PDAPP	Primer ratón transgénico con mutación de la APP, con abundantes rasgos histopatológicos de la EA. Su patología empieza a partir de los 6 meses de edad.
APP23	Ratones que expresan una mutación en el gen APP ^{swe} bajo el control de un promotor (Thy1). La patología comienza a los 6 meses.
PSAPP	Ratón doble transgénico, con los genes APP ^{swe} y PSEN1 con una acelerada patología amiloidogénica.
TauP301S	Ratones transgénicos que expresan una corta isoforma del 4RMAPT con una mutación del gen P301S. Presentan una patología neurofibrilar a los 5 meses de edad.
Htau	Ratones que expresan el gen humano para MAPT, y acumulan gran cantidad de MAPT hiperfosforilada.
3xTgAD	Triple ratón transgénico que tienen 3 mutaciones: APP ^{swe} , PS1 ^{M146} y Tau ^{P301L} .
5xFAD	Ratones quintuples transgénicos con 3 mutaciones en el gen APP ⁶⁹ , y otras dos en el gen presenilina 1.(Torika <i>et al.</i> ; 2017.)

Hasta ahora, uno de los ratones transgénicos que reproducen mejor la EA, son los 3xTgAD. Oddo y colaboradores (2003) desarrollaron este modelo de la EA, y los ratones presentan disfunción sináptica y placas de β A a los pocos meses, más adelante presentan marañas neurofibrilares.

El ratón transgénico Tg2576, es un modelo de la EA muy agresivo ya que genera desde los 2 meses de edad, placas de beta amiloide en diferentes estructuras del cerebro, ocasionando diversos déficits cognitivos (Nobili *et al.*; 2017).

El modelo más reciente, el ratón transgénico (5XFAD), posee cinco mutaciones genéticas en dos distintos genes humanos. De las cinco mutaciones, tres de ellas en el gen APP⁶⁹⁵ (Swedish K670N, M671L; Florida I716V y London V717I) y las otras dos en PS1, (M146L, L286V) con el promotor transcripcional Thy 1 (Torika *et al.*; 2017.).

2.6.2 Modelos no transgénicos

Los modelos no transgénicos para la enfermedad de Alzheimer, pueden emular tan bien la patogenia de la enfermedad como cualquier modelo de tipo transgénico.

La infusión de las proteínas causantes de gran parte de la sintomatología de la enfermedad en ciertas regiones del cerebro, pueden arrojar resultados similares como si tuvieran realmente la afección. Existen variadas formas de beta amiloide, como monómeros, y oligómeros fibrilares y prefibrilares, y su constitución molecular dictamina su toxicidad (Glabe; 2008). En esta investigación se utilizó βA_{1-42} que es más tóxico que βA_{1-40} . Itoh y colaboradores, (1996) administraron diariamente durante 12 días βA_{1-25} en el hipocampo de ratas, y demostraron que tenían déficit de memoria y aprendizaje en un par de pruebas cognitivas. Así mismo Moreno-Castilla y colaboradores, (2016) también administraron βA_{1-42} en la corteza insular de ratones de 3 meses, y observaron una reducción significativa de las terminales catecolaminérgicas.

3. Antecedentes

En 1999 un grupo de colaboradores encontraron un déficit en general en el sistema colinérgico de pacientes geriatras con la EA, utilizando marcadores enzimáticos en la neocorteza (Davis *et al.*; 1999).

En la década de los 80's, surgió una hipótesis que intentaba explicar cómo es que la pérdida de neuronas colinérgicas, producía la sintomatología de la EA.

Y pese a que muchos investigadores no consideren que las alteraciones en el sistema colinérgico representen gran parte de la etiología de la EA (Craig, Hong, and McDonald; 2011a), hay investigaciones que arrojan resultados contundentes en cuanto a la participación del sistema colinérgico con un marcado deterioro neuronal (Muir; 1997).

Investigaciones realizadas en primates como las de Jones y colaboradores (1976), indican que núcleo basal de Meynert, constituye una gran parte de la sustancia innominada y posee una serie de grandes y largas neuronas colinérgicas, que a su vez reciben aferencias de la amígdala, el hipocampo y el hipotálamo (Smith and Parent; 1984). Esto indica que la extensa red colinérgica está altamente relacionada con la memoria y el aprendizaje.

La corteza cingulada posterior, se ubica en la parte medial del lóbulo parietal, se relaciona ampliamente con la atención (Leech *et al.*; 2011), tiene muchas conexiones con otras estructuras y ésta se ve comprometida en muchas enfermedades neurodegenerativas (Leech and Sharp; 2014).

En la EA hay una gran pérdida de neuronas del núcleo basal de Meynert y por ende, de la sustancia innominada y esto lo relacionaban con un deterioro cognitivo (Whitehouse *et al.*; 1981). Sin embargo, hay investigaciones que reportan que la dopamina esté posiblemente afectada en personas con la EA (Portet *et al.*; 2009), aunque su participación no es clara.

Así mismo, ratones transgénicos de 4 a 6 meses de edad, muestran una disminución de dopamina en el cuerpo estriado (Perez *et al.*; 2005).

Es relevante saber por qué estos dos sistemas se relacionan entre sí. Existen interacciones entre las neuronas catecolaminérgicas y las neuronas colinérgicas, y las aferencias noradrenérgicas tienen amplias conexiones en el prosencéfalo basal (Zaborszky and Cullinan; 1996).

No obstante, el sistema catecolaminérgico también se puede encontrar claramente afectado. En 1996, Itoh y colaboradores, realizaron un experimento, el cual consistía en la administración diaria (durante 14 días) de β -Amiloide₁₋₄₀ en ratas, en la corteza prefrontal y en el hipocampo, y demostraron que la dopamina disminuía primero que la acetilcolina.

Por otro lado, Moreno-Castilla y colaboradores (2016) reportan que la administración de oligómeros de β A₁₋₄₂ en ratones WT, causa una importante pérdida de terminales catecolaminérgicas, y así mismo una pérdida de dopamina en la corteza insular. Estos antecedentes apoyan fuertemente este trabajo de investigación.

3.1. Alteraciones neuroquímicas en la EA

Es bien sabido que en la EA, hay un desequilibrio en general en muchas regiones del cerebro, en consecuencia también en los neurotransmisores. Una pérdida de homeostasis en el Ca^{2+} intracelular, ocasiona muchas alteraciones neuronales (Magi *et al.*; 2016).

Estudios como los de Romano y colaboradores (2015) indican que una pérdida sustancial de neurotransmisores con grupo amina (como la serotonina -5-HT-), producen depresión y ansiedad en ratones 3xTg-AD.

Otra alteración neuroquímica en la EA es una reducción significativa de las neuronas, y cambios morfológicos de las mismas en el Locus coeruleus (LC), en consecuencia hay un déficit de noradrenalina (Chan-Palay and Asan; 1989).

Así mismo, neurotransmisores como el glutamato y GABA (ácido-gamma aminobutírico), se ven disminuidos en el hipocampo en la EA (Huang *et al.*; 2017).

3.2. Hipótesis colinérgica de la EA

La hipótesis colinérgica fue la primera teoría propuesta para explicar la EA y hasta ahora y desde entonces se han desarrollado fármacos aprobados para tratar la EA de leve a moderada (Bartus; 2000).

Las neuronas colinérgicas son la fuente principal de acetilcolina en la corteza, su declive y/o disfunción se correlacionan directamente con una discapacidad cognitiva en general (Perry *et al.*; 1978).

Drachmann y sus colaboradores determinaron que el bloqueo de los receptores muscarínicos colinérgicos da como resultado a una disfunción cognitiva similar a la de los pacientes con edad avanzada (Drachman and Leavitt; 1974).

No es de sorprender que, a pesar de ser la primer propuesta de las muchas que hay para la explicación de esta enfermedad, aún se aúpan en ella para el tratamiento de EA, y su importancia estriba en lo esencial que es el sistema colinérgico en el Sistema Nervioso Central (SNC).

Algunas investigaciones realizadas tales como la de Farlow y colaboradores, 1992, indican que los medicamentos procolinérgicos tienen un fructífero rol en el tratamiento de la disfunción cognitiva asociada a la EA. En otras palabras, esta hipótesis relaciona la pérdida de memoria vinculada con la edad y una disfunción en el sistema colinérgico.

Los fármacos utilizados para el tratamiento de la EA en diferentes etapas de la enfermedad son inhibidores irreversibles de la ACe, esta enzima es altamente eficiente, e hidroliza a la ACh en colina y acetato (Purves; 2008).

3.3. Alteraciones en la neurotransmisión dopaminérgica

Se conocen más de 100 agentes diferentes que actúan como neurotransmisores. Esta gran cantidad de transmisores permite una gran diversidad en la señalización química entre las neuronas.

No obstante, solo algunos de ellos tales como la serotonina (5-HT), la dopamina (DA), la noradrenalina (NA) participan de manera importante en la cognición y la memoria (Lisman, Grace, and Duzel; 2011).

El glutamato, por ejemplo es el neurotransmisor más importante para la función normal del cerebro. Gran parte de las neuronas excitadoras del SNC son glutamatérgicas (Purves; 2008).

Las catecolaminas son un grupo de neurotransmisores (adrenalina, noradrenalina y dopamina) que derivan de un precursor común, la tirosina, y se llaman así ya que tienen un grupo catecol (Purves; 2008).

Las catecolaminas en el SNC participan en la cognición y la memoria, y un déficit de estas se relaciona con enfermedades como esquizofrenia, enfermedad de Parkinson (EP) y trastornos de atención (Clark and Noudoost; 2014). Aunque no está claro qué papel juegan en la EA.

En 2013, Sato y colaboradores, demostraron que cuando la molécula de catecol se oxida, logra disgregar a βA_{1-42} .

Una catecolamina indispensable para muchos procesos cognitivos es la dopamina (DA). La dopamina es un neurotransmisor muy relacionado con la recompensa. Schultz, Apicella, y Ljungberg (1993), demostraron (en monos) como una gran cantidad de neuronas dopaminérgicas eran activadas en pruebas de recompensa con diferentes estímulos apetitivos, y a su vez, encontraron que estas se activaban al presentarles un estímulo novedoso.

Por otro lado la DA, se encuentra tremendamente asociada con la cognición, ya que muchas proyecciones de la corteza prefrontal usan este neurotransmisor

como mensajero (Ranganath and Jacob; 2016). Por ende, este es un importantísimo neurotransmisor que se halla implicado en la plasticidad neuronal.

No obstante, en cuanto a sus alteraciones, Moreno-Castilla y colaboradores (2016), encontraron una relación indirectamente proporcional entre la acumulación de beta amiloide y una disfunción tanto en la memoria como en la plasticidad cortical. Por lo tanto, se puede remarcar la importancia que tiene la DA en cuanto a cognición, memoria y presentación de estímulos novedosos.

3.4. Alteraciones en la neurotransmisión noradrenérgica

El *locus coeruleus* (LC) es la principal fuente de NA en todo el cerebro, y la distribución de sus fibras conecta tanto estructuras corticales como subcorticales (Berridge and Waterhouse; 2003).

El LC es especialmente sensible a la presentación de nuevos ambientes, y así mismo la noradrenalina (NA) está vinculada con la consolidación de la memoria (Takeuchi *et al.*; 2016). Por lo tanto la NA es un neurotransmisor crucial en la participación de la memoria.

En cerebros con la EA, hay una pérdida significativa en el número de neuronas del LC, y también existe un cambio morfológico de las mismas, reduciendo el tamaño de sus fibras (Chan-Palay and Asan; 1989), esto se puede traducir como una pérdida sustancial de NA.

Así mismo una pérdida sustancial de algún neurotransmisor puede conllevar a la reducción de otro.

En algunas enfermedades neurodegenerativas, tales como la EA o EP, se observa una fuerte correlación entre la pérdida significativa de las neuronas noradrenérgicas y las dopaminérgicas (Vermeiren and De Deyn; 2017). Esto nos sugiere que un tratamiento alterno para noradrenalina o dopamina no estaría de más, en etapas más tempranas de la enfermedad.

4. Planteamiento del problema.

Existen investigaciones que reportan una disfunción en el sistema colinérgico en etapas avanzadas de la EA. No obstante, también hay investigaciones que han sugerido una probable disfunción en el sistema catecolaminérgico, pero en etapas más tempranas de la enfermedad, sin embargo no hay nada contundente al respecto.

Esto conduce a investigar la implicación que tiene la dopamina en un modelo para la EA. De existir una disfunción, hay que comprobar si es consecuencia de la enfermedad. Luego entonces, se compararán los sistemas de neurotransmisión colinérgico y catecolaminérgico con el fin de averiguar qué sistema de neurotransmisión resulta estar más afectado por los efectos negativos del péptido βA_{1-42} .

5. Objetivos:

Comparar el efecto del péptido beta amiloide sobre las proyecciones corticales del cíngulo e hipocampales del sistema de neurotransmisión colinérgico y catecolaminérgico en un modelo esporádico para la enfermedad de Alzheimer.

4.1. Objetivos Particulares:

- Cuantificar las terminales axónicas, en la región hipocampal cuerno de Amón 1 (CA1), de ambos sistemas de neurotransmisión (catecolaminérgico y colinérgico), 24 horas después de haber administrado βA_{1-42} .
- Cuantificar las terminales axónicas, en la región de la corteza cingulada posterior de ambos sistemas de neurotransmisión (catecolaminérgico y colinérgico), 24 horas después de haber administrado βA_{1-42} .

6. Hipótesis.

El sistema de neurotransmisión catecolaminérgico es más sensible a los efectos tóxicos del péptido βA_{1-42} , que el sistema colinérgico.

7. Metodología Experimental.

7.1. Animales.

Se utilizaron 3 ratones de 6 meses de edad de la misma cepa Wild Type (WT) con tratamiento de βA_{1-42} en un hemisferio cerebral (izquierdo) 24 horas antes de la eutanasia. El hemisferio cerebral no tratado (derecho) se tomó como el lado control.

Todos los ratones se encuentran en el “vivarium“, un espacio exclusivo para animales en experimentación, ubicado en el Instituto de Fisiología Celular, Ciudad Universitaria, mantenidos y cuidados de acuerdo a lo establecido en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio y a cargo de las reglas y normas del CICUAL (Comité Interno para el Cuidado y uso de los Animales de Laboratorio).

7.2. Cirugía estereotáxica.

Se anestesia al ratón con isofluorano (un anestésico inhalado), después este se monta en un aparato estereotáxico.

Se realiza asepsia con clorhexidina y se rasura la cabeza del animal, para poder realizar una pequeña incisión medial y así exponer el cráneo y ubicar las fusiones de los huesos craneales. Se les realizó una trepanación unilateral en el hemisferio izquierdo, a la altura del hipocampo (CA1) con las siguientes coordenadas: con respecto a bregma AP= +2.5, ML= -0.5, DV= -1.4 y las coordenadas para la corteza cingulada posterior fueron las siguientes: AP= +2.5, ML= 0.5, DV= 0.5 (Paxinos and Franklin's the Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates, 4th Edition; 2012).

Se les administraron (con ayuda de una bomba Hamilton) 0.5 μ L de βA_{1-42} Millipore (Temecula, CA) a una velocidad de 0.25 μ L/ min, a una concentración de 4 μ M, en ambas regiones.

7.3. Perfusión y eutanasia.

Se les administró vía intraperitoneal una dosis letal de pentobarbital sódico (0.126g, Pisabental, PiSA Agropecuaria, S.A. de C.V.), para después pasar a ser perfundidos.

La perfusión se realizó vía intracardiaca, incidiendo transversalmente en el tórax, justo por el borde del diafragma, y penetrando a la cavidad torácica (véase figura 5), exponiendo el corazón mientras el animal se encuentra anestesiado.

Se le realizó un corte transversal parcial a la arteria aorta y de inmediato se administran por medio del ápice cardiaco (penetrando el ventrículo), 10 mL de SSF (solución salina fisiológica) al 0.9%, de manera lenta y constante para evitar dañar los vasos sanguíneos, e inmediatamente se le administran 10 mL de PFA (paraformaldehído) al 4% usando el mismo método.

Posteriormente se les extrae el cerebro (rompiendo el cráneo por la mitad) y se deja conservar 48 horas en paraformaldehído al 4%. Una vez realizado eso los cerebros se pasan a un medio de sacarosa al 30% durante 48 horas.

A todos los animales se les aplicó la eutanasia de acuerdo a lo establecido en la NOM-062-ZOO-1999 y en la Norma Oficial Mexicana NOM-033-ZOO-1995, Sacrificio humanitario de los animales domésticos y silvestres, y por las reglas del CICUAL (Comité Interno para el Cuidado y uso de los Animales de Laboratorio).

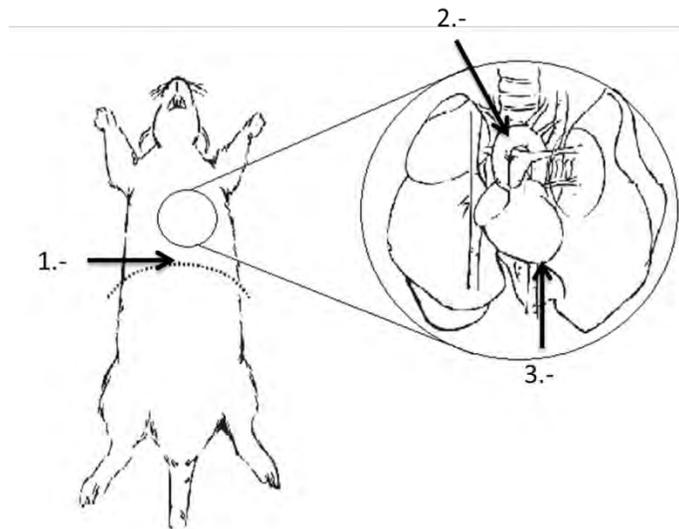


Figura 5. Representación gráfica de la perfusión. Antes que nada se debe colocar al animal en una posición decúbito dorsal y colocar los miembros torácicos y pelvianos extendidos. 1.- Se incide aproximadamente por el proceso xifoides de manera transversal para llegar a cavidad torácica. 2.- Se hace una incisión parcial a la aorta. 3.- Se administran la SSF e inmediatamente el PFA. Imagen modificada del artículo de Ruiz-Pérez, Largo, and García-Río; 2016.

7.4. Seccionar cerebros.

Para este procedimiento se utiliza un criostato (Leica Byosystems® CM1520), el cual se requirió para rebanar el cerebro en cortes coronales de 35 micrómetros de espesor.

7.5. Inmunohistoquímica para ChAT, TH.

Se utilizaron los cortes previamente seccionados a 35 micrómetros, y se seleccionaron aquellos cortes cuyas regiones observables fueran un hipocampo posterior -es decir de buen tamaño observable a 10x- y la corteza cingulada posterior (para dicha selección se utilizó el atlas para ratón Paxinos and Franklin's the Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates; 2012).

Se utilizó un protocolo de inmunofluorescencia que dura 2 días. El primer día se realizan 3 lavados a los cortes con un buffer trizma al 0.1M y NaCl al 0.9%, pH 7.4 (TBS 1x), durante 10 minutos en agitación constante (con un agitador orbital).

Después se realizan 3 lavados con tritón, (un detergente) que ayuda a abrir poros en la membrana de las células para que puedan penetrar los anticuerpos, y 3 lavados con TBS 1x en agitación a temperatura ambiente. Se realiza otro lavado con TBS 1x más tritón (TBST) al 0.3% y Suero de Albúmina bovino al 5%(solución de bloqueo) durante 30 min en agitación constante, a temperatura ambiente. Posteriormente se incuban los anticuerpos primarios, procedimiento que se realiza en un cuarto que está una temperatura de 4°C durante 48 horas.

Para realizar dicha técnica se requirieron los siguientes anticuerpos primarios:

- ChAT (Anti-Choline Acetyltransferase Antibody, Merck Millipore, E.U.A.), a una concentración de 1:50/500µL.
- TH (Anti-Tyrosine hydroxylase Antibody, Pel-Freez, U.S.A.), a una concentración de 1:500/500µL.

En el día dos se realizan 6 lavados más con TBS1x cada uno de 10 min. Posteriormente se agregan los anticuerpos secundarios.

- ChAT (Donkey anti-Goat IgG Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 647, Thermo Fischer, U.S.A.), 1:250/500µL.
- TH (Goat Anti-Rabbit IgG Antibody, Cy3 conjugate, Species Adsorbed, Millipore, U.S.A.), 1:250/500µL.

Se realizan 3 lavados más, con TBS 1x, y se le agrega DAPI (*4',6-diamino-2-fenilindol*) un marcador de ADN, durante 30 seg. El montaje se lleva a cabo en laminillas silanizadas (VWR, Leuven, Bélgica) y medio de montaje especial para inmunofluorescencia Dako (Dako, USA).

7.6. Cuantificación usando estereología.

La estereología es una técnica utilizada comúnmente en investigación, para cuantificar secciones de estructuras y objetos tomando como parámetros densidad de volumen, densidad de superficie, densidad numérica y densidad de longitud, de

la sección a cuantificar, a partir de imágenes bidimensionales (MBF Bioscience; 2017). La cuantificación de las terminales fueron posibles gracias a un software llamado Stereo Investigator®, y este se especializa en contar diversos objetos en tres dimensiones.

Uno de las aplicaciones que se utilizó en este trabajo de investigación fue una llamada “spaceballs”.

Estos recientes métodos estereológicos ya descritos anteriormente se utilizaran para medir la longitud total de las terminales* o fibras colinérgicas corticales, una cuantificación morfológica del alto grado de inervación colinérgica (Calhoun and Mouton; 2001).

En la figura 6, se puede observar como el programa utiliza tres planos dimensionales, asignando manualmente el número de cortes a cuantificar, así como su grosor y el tamaño de la malla.

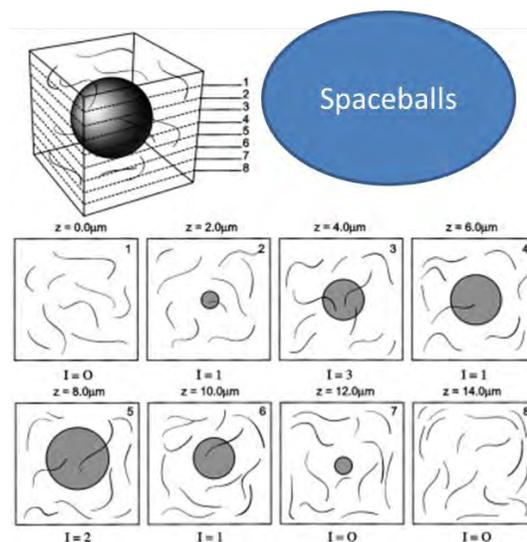


Figura 6. Spaceballs como método para cuantificar terminales o fibras. La dimensión “z” indica el grosor de la muestra, observando un efecto de un círculo haciendo grande y luego pequeño. (Figura modificada de Calhoun and Mouton; 2001).

* Por términos prácticos al indicar una disminución en las terminales, nos referimos a la longitud total de las mismas.

En esta investigación las áreas a cuantificar fueron hipocampo (CA1), y la corteza cingulada posterior, así luce la morfología de las terminales de ambos sistemas de neurotransmisión (figura 7).

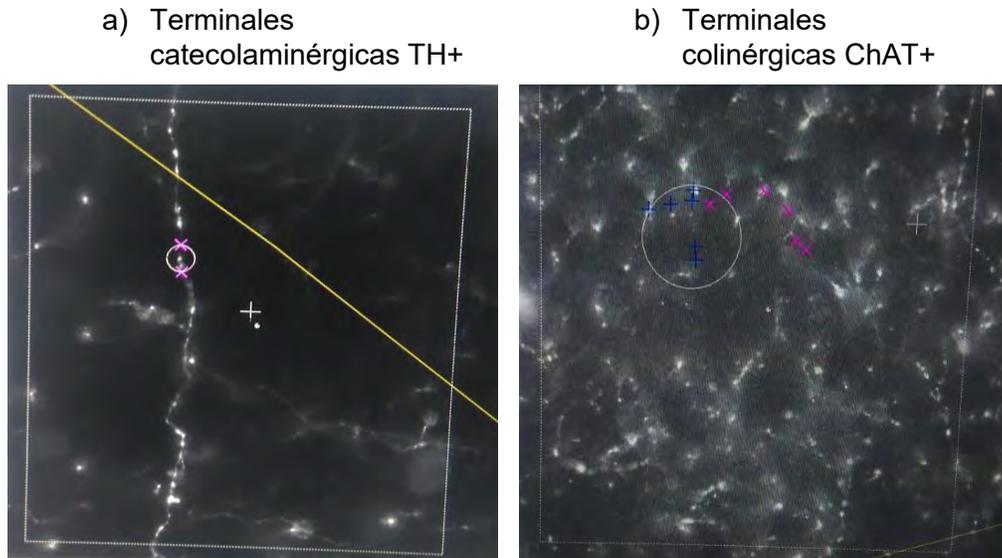


Figura 7. a) Imagen representativa de la morfología de las terminales axónicas del sistema catecolaminérgico (se puede observar una fibra muy evidente). b) Imagen representativa de la morfología de las terminales axónicas del sistema colinérgico. Fotos tomadas del programa “stereo investigator®”.

La estereología fue realizada en el Instituto de Ciencias Biomédicas, UNAM, en el área de microscopía, a cargo del Dr. Miguel Tapia. Se utilizó un microscopio Olympus Bx51WI, el cual está equipado con un módulo confocal de disco giratorio, una lámpara de mercurio, una platina motorizada y una cámara Hamamatsu C9100 EM-CD, con resolución temporal de 32 frames/s y resolución espacial de 1024 (H)x1024 (V). Para el trazado de la malla de conteo se empleó el objetivo 4x, y para la cuantificación un objetivo de 60x. El tamaño de la malla fue de 180x180 en todos los casos, el número de cortes utilizados fueron 5 y el coeficiente de error de Gundersen* en todos los casos fue menor a 0.10.

*Si el coeficiente de error de Gundersen es menor a 0.10, nuestros datos serán estadísticamente válidos.

Las fotografías representativas de cada estructura se tomaron en un microscopio confocal de la unidad de Microscopía del IFC, el cual está equipado con láseres de LD y luz ultravioleta. Se les procesó con un software llamado "ImageJ" que convirtió las imágenes a 8 bits.

8. Resultados

En la figura 8, se encuentran las diferencias morfológicas de las terminales de ambos sistemas de neurotransmisión, en las dos diferentes regiones del cerebro donde se llevó a cabo la cuantificación.

Se puede notar claramente que en el hipocampo CA1, hay un número mucho mayor de terminales colinérgicas que catecolaminérgicas ($t_{(1,4)}=2.979$, $p=0.0408$). Al realizar el análisis estadístico, la corteza cingulada posterior, no se observa una diferencia significativa ($t_{(1,4)}=0.2710$, $p=0.7998$)

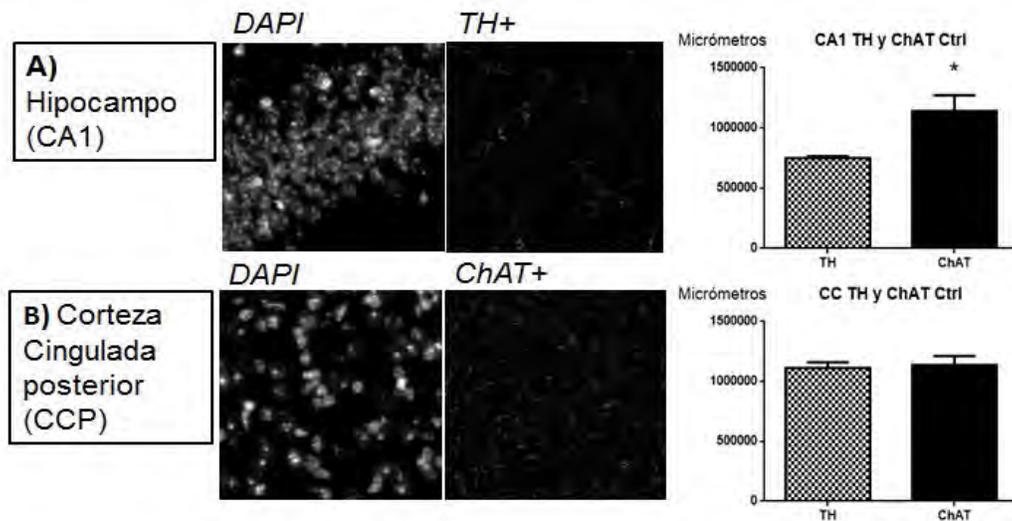


Figura 8. Inmunofluorescencia de terminales catecolaminérgicas y colinérgicas. A) Fotos representativas de los núcleos neuronales (marcadas con DAPI) en la región CA1 del hipocampo, y terminales inmunoreactivas contra tirosina hidroxilasa (TH+), con su respectiva gráfica de la cuantificación (n=3) de dichas terminales (*p=0.0408). B) Fotos representativas de los núcleos neuronales (marcadas con DAPI) en la región de la Corteza cingulada posterior, y terminales inmunoreactivas contra colina Acetiltransferasa (ChAT+), y su respectiva cuantificación (n=3) de dichas terminales (p=0.7998).

La cantidad de terminales catecolaminérgicas en CA1, disminuyó significativamente posterior a la administración de βA_{1-42} .

En la figura 9, se puede apreciar una significativa reducción de las terminales catecolaminérgicas del grupo tratado con β Amiloide $_{1-42}$, con respecto al grupo control (no tratado) en el hipocampo ($t_{(1,4)}=3.684$, $p=0.0211$).

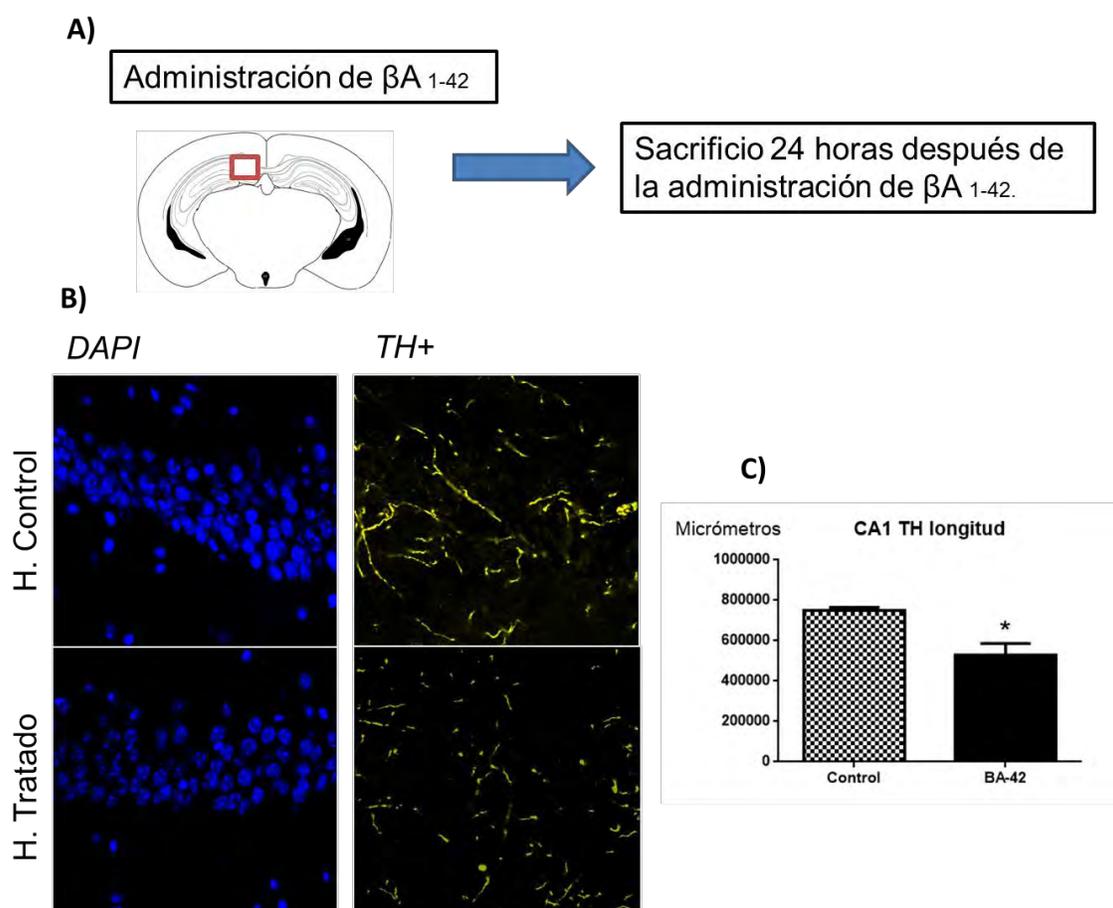


Figura 9. Inmunofluorescencia de terminales catecolaminérgicas y colinérgicas. A) Esquema que representa en un cerebro de ratón WT CH3/HJ3 de 6 meses de edad, la administración de oligómeros del péptido βA_{1-42} , en la región hipocampal CA1 (contorno rojo). B) Fotos representativas de los núcleos en el hipocampo (DAPI, azules) y terminales inmunoreactivas contra TH+ (catecolaminérgicas, amarillas) del grupo control y del grupo tratado. C) Cuantificación ($n=3$) de las terminales catecolaminérgicas en la región del hipocampo CA1 del grupo control y el tratado (* $p=0.0211$).

La cantidad de terminales colinérgicas en CA1 disminuyó, pero no es significativo, posterior a la administración de βA_{1-42} .

En la figura 10, se observa el efecto negativo de los oligómeros péptido β Amiloide $_{1-42}$ administrados en el hipocampo (CA1) y también disminuye la cantidad de terminales colinérgicas, no obstante se observa que las terminales más afectadas son las catecolaminérgicas ($t_{(1,4)}=2.015$, $p=0.1141$).

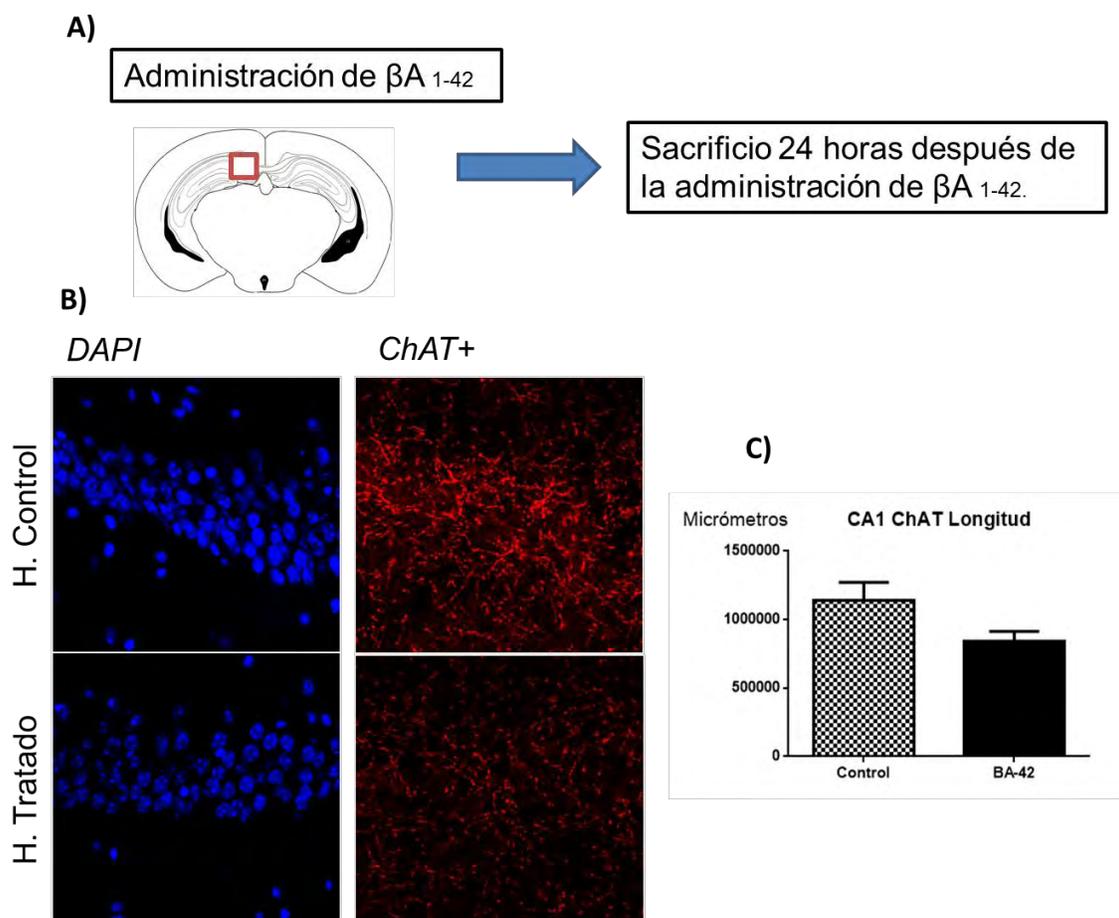


Figura 10. Inmunofluorescencia de terminales catecolaminérgicas y colinérgicas. A) Esquema que representa en un cerebro de ratón WT CH3/HJ3 de 6 meses de edad, la administración de oligómeros del péptido βA_{1-42} , en la región hipocampal CA1 (contorno rojo) B) Fotos representativas de los núcleos en el hipocampo (DAPI, azules) y terminales inmunoreactivas contra ChAT+ (colinérgicas, rojas) del grupo control y del grupo tratado. C) Cuantificación ($n=3$) de las terminales colinérgicas en el hipocampo del grupo control y el grupo tratado ($p= 0.1141$).

La cantidad de terminales catecolaminérgicas en la corteza cingulada disminuyó sustancialmente posterior a la administración de βA_{1-42} .

En la figura 11, se observa también una reducción significativa de las terminales catecolaminérgicas en la corteza cingulada con respecto al grupo control ($t_{(1,4)}=4.587$, $*p=0.0101$).

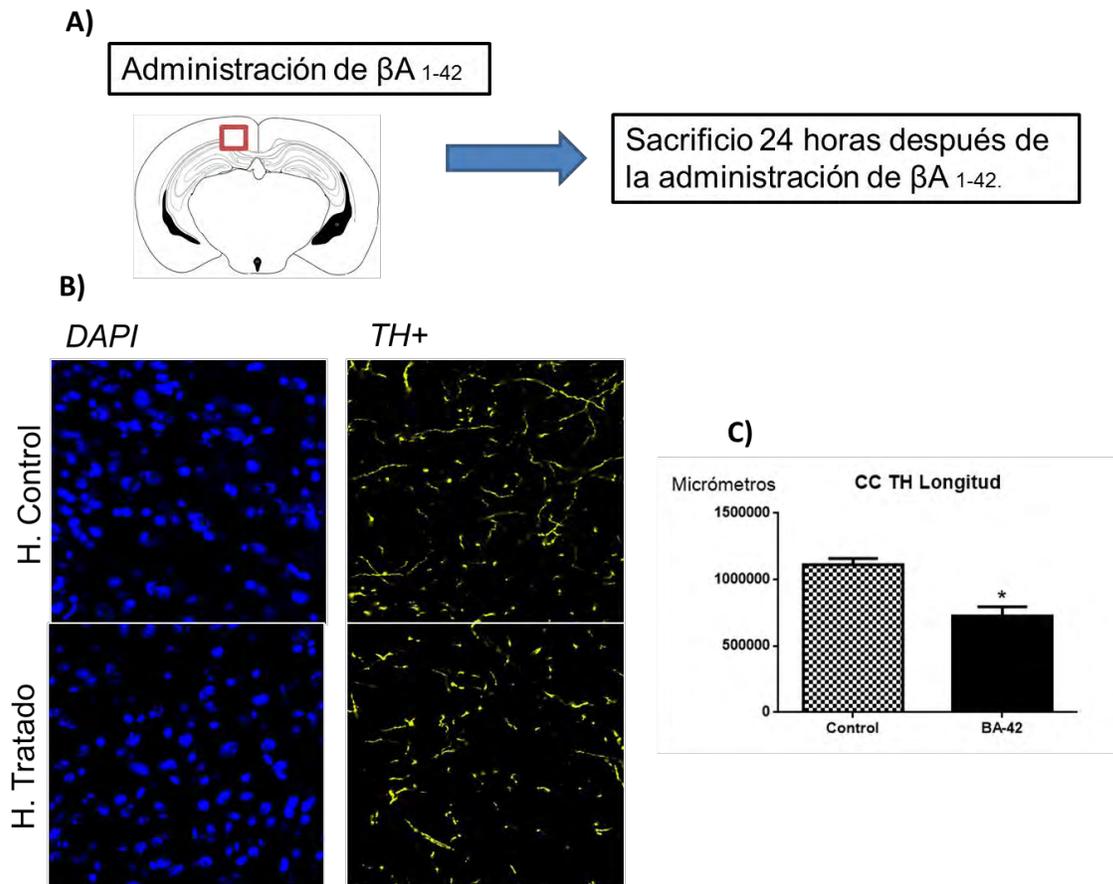


Figura 11. Inmunofluorescencia de terminales catecolaminérgicas y colinérgicas. A) Esquema que representa en un cerebro de ratón WT CH3/HJ3 de 6 meses de edad, la administración de oligómeros del péptido βA_{1-42} , en la corteza cingulada posterior (contorno rojo). B) Fotos representativas de los núcleos en corteza cingulada posterior (DAPI, azules) y terminales inmunoreactivas contra TH+ (catecolaminérgicas, amarillas) del grupo control y del grupo tratado. C) Cuantificación ($n=3$) de las terminales catecolaminérgicas en la corteza cingulada posterior del grupo control y el grupo tratado ($*p=.0101$).

La cantidad de terminales catecolaminérgicas en la corteza cingulada disminuyó significativamente posterior a la administración de βA_{1-42} ($t_{(1,4)}=2.830$, $p=0.0474$).

En la figura 12, también se puede apreciar claramente una pérdida en las terminales colinérgicas, no obstante, la pérdida es menos significativa que la del sistema catecolaminérgico mostrado en la figura 13.

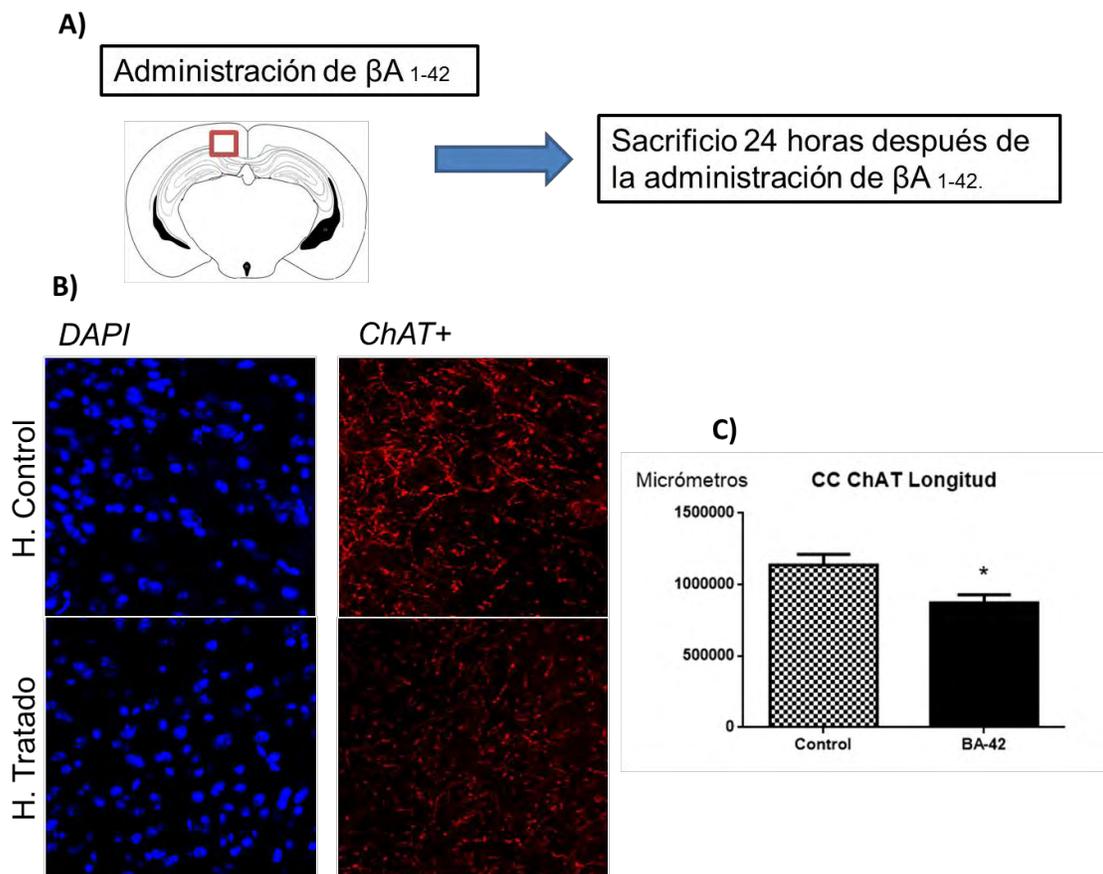


Figura 12. Inmunofluorescencia de terminales catecolaminérgicas y colinérgicas. A) Esquema que representa un cerebro de ratón WT CH3/HJ3 de 6 meses de edad, la administración de oligómeros del péptido βA_{1-42} , en la corteza cingulada posterior (contorno rojo). B) Fotos representativas de los núcleos en corteza cingulada posterior (DAPI, azules) y terminales inmunoreactivas contra ChAT+ (colinérgicas, rojas) del grupo control y del grupo tratado. C) Cuantificación ($n=3$) de las terminales colinérgicas en la corteza cingulada posterior del grupo control y el grupo tratado (* $p=0.0474$).

La figura 13 muestra el porcentaje de pérdida de las terminales catecolaminérgicas y colinérgicas en ambas regiones, hipocampo (CA1) y corteza cingulada posterior, se observa una mayor pérdida en la corteza cingulada posterior que en el hipocampo.

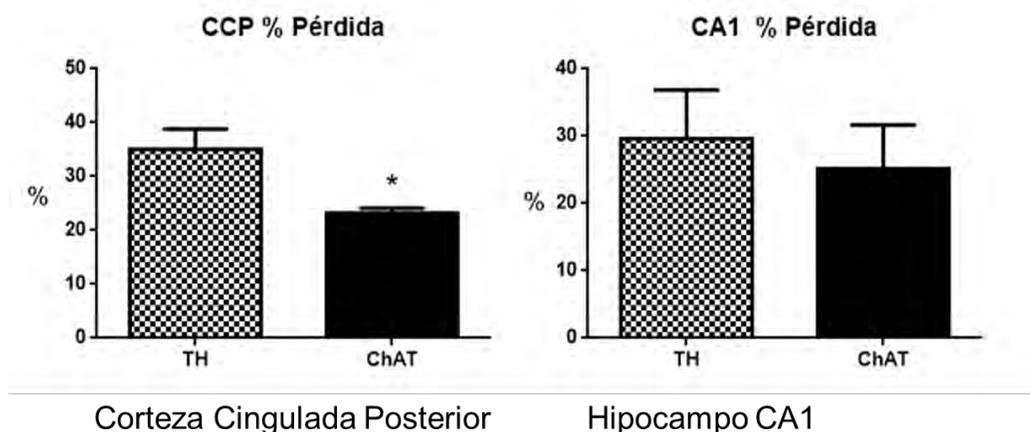


Figura 13. La pérdida es significativa ($t_{(1,4)}=3.101$, $*p=0.0372$) alrededor de un 35 % en la corteza cingulada de TH+ con respecto a ChAT, no siendo así en el hipocampo ($t_{(1,4)}=0.4571$, $p=0.6713$).

9. Discusión

En el presente trabajo se comparó el efecto del péptido βA_{1-42} en ambos sistemas de neurotransmisión (catecolaminérgico y colinérgico) observando que uno de ellos resultó estar más afectado que el otro tras 24 horas de la administración intracerebral en ambas zonas, tanto en hipocampo como en corteza cingulada posterior. Esto indica que la dopamina sí participa desde etapas tempranas de la EA.

Martorana y Koch 2014, discuten acerca del papel que juega la dopamina en la EA, dando argumentos contundentes acerca de su probable disfunción y esto se relaciona con los datos obtenidos de este trabajo.

Anatómicamente, las neuronas colinérgicas reciben proyecciones de las neuronas catecolaminérgicas en el prosencéfalo basal (Zaborszky and Cullinan; 1996), esto también puede apoyar el hecho de que una depleción del sistema catecolaminérgico preceda a una disfunción del colinérgico.

Así mismo, algunas investigaciones reportan que a las dos horas de administrar βA_{1-42} disminuye la cantidad de dopamina en la corteza prefrontal en ratas, después de una estimulación con potasio (Trabace *et al.*; 2007). Estos resultados son consistentes con los obtenidos en este trabajo de investigación, ya que un sistema de neurotransmisión parece ser más sensible ante los efectos del péptido βA .

Otro trabajo que sustenta la relevancia del sistema catecolaminérgico en la EA, fue uno donde treinta personas con la EA fueron evaluadas, y sólo los individuos que consumieron un agonista de dopamina (rotigotina), lograron mejorar su plasticidad cortical (Koch *et al.*; 2014). Esto es un indicativo de un muy probable rol de la dopamina en la EA.

Sin embargo, un estudio realizado en personas con la EA, demostró que se acumula una buena cantidad de β -Amiloide $1-42$ en el prosencéfalo basal (Baker-Nigh *et al.*; 2015), donde hay una gran cantidad de neuronas colinérgicas (Jones

et al.; 1976). Esto indica que los efectos tóxicos β A, afectan a un gran número de neuronas colinérgicas. La hipótesis colinérgica está basada en el hallazgo de una pérdida de la actividad colinérgica, que es comúnmente observada en pacientes que padecen de la EA (Craig, Hong, and McDonald; 2011b). Es por ello que el déficit de memoria y aprendizaje lo atribuyen principalmente a la masiva pérdida de neuronas colinérgicas del núcleo basal de Meynert (Muir; 1997).

Otro argumento a favor de la participación del sistema colinérgico en la EA se basa en la observación de que cuando a adultos jóvenes se les administran anticolinérgicos, tales como la escopolamina, mostraron un deterioro cognitivo (Lian *et al.*; 2017), como se observa en personas con la EA.

A pesar de todo, las investigaciones mencionadas anteriormente, indican una pérdida de dopamina en primera instancia.

No se le debe conferir todo lo negativo que ocurre en cuanto a la patogenia de la enfermedad a beta amiloide, ya que este péptido en condiciones normales, tiene un papel crucial en la formación y mantenimiento de la memoria (Garcia-Osta y Alberini; 2009), pero sí participa de manera crucial cuando empieza a agregarse en mayor cantidad, es por ello que como lo sugieren los resultados obtenidos en este trabajo, β A tenga una importante participación. Hay modelos de la EA que trabajan con β A, que son suficientes para inducir disfunciones en muchos sistemas neuronales (Palop and Mucke; 2010).

El presente trabajo señala partes importantes en cuanto a los sistemas de neurotransmisores de dichas estructuras y su relación con β A. No obstante, se pueden ampliar los resultados de esta investigación, realizando otra cuantificación pero en cerebros de ratones transgénicos.

Así mismo, el trabajo puede ser complementado haciéndoles diversas pruebas a los ratones pero de tipo conductual. Es decir, que pasaría si después de inducir β -Amiloide en las estructuras estudiadas, se realizaran pruebas conductuales para poder evaluar su capacidad cognitiva y memoria en todos los casos, y poder realizar las cuantificaciones y estadísticas correspondientes.

10. Conclusiones

La administración de oligómeros del péptido βA_{1-42} en ambas regiones del cerebro (hipocampo y corteza cingulada posterior), ocasionó una disfunción en los dos sistemas neuroquímicos que se analizaron, el colinérgico y el catecolaminérgico. Sin embargo el sistema catecolaminérgico sufrió una mayor pérdida de terminales que el colinérgico 24 horas después de la administración.

Se demostró, que el número de terminales en el grupo experimental disminuyó significativamente en cada uno de los casos con respecto al grupo control. No obstante, los resultados variaron en función a la región de interés y al sistema de neurotransmisión.

En cuanto al hipocampo y a la corteza cingulada posterior las terminales del sistema catecolaminérgico tuvieron una sustancial reducción. Si las comparamos con las terminales colinérgicas, estas se vieron menos afectadas en ambas zonas.

Estos resultados arrojan la conclusión de que el sistema catecolaminérgico es más susceptible al péptido βA_{1-42} que el sistema colinérgico, y se puede subrayar el hecho de que el tratamiento de elección para la enfermedad de Alzheimer está diseñado para aminorar la pérdida de acetilcolina, cuando en etapas tempranas de la enfermedad, pueda funcionar mejor un fármaco que mejore la disfunción catecolaminérgica, con posibles mejores resultados.

Mientras más se conozca el funcionamiento de los neurotransmisores y su relación con la patogenia de la enfermedad, será más probable encontrar una solución al problema.

11. Referencias

Alonso, A. C., T. Zaidi, I. Grundke-Iqbal, and K. Iqbal, (1994). Role of Abnormally Phosphorylated Tau in the Breakdown of Microtubules in Alzheimer Disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91(12): 5562–5566.

Baker-Nigh, Alaina, Shahrooz Vahedi, Elena Goetz Davis, Sandra Weintraub, Eileen H. Bigio, William L. Klein and Changiz Geula, (2015). Neuronal Amyloid- β Accumulation within Cholinergic Basal Forebrain in Ageing and Alzheimer's Disease. *Brain* 138(6): 1722–1737.

Bartus, R. T., (2000). On Neurodegenerative Diseases, Models, and Treatment Strategies: Lessons Learned and Lessons Forgotten a Generation Following the Cholinergic Hypothesis. *Experimental Neurology* 163(2): 495–529.

Bennett, D. A., J. A. Schneider, Z. Arvanitakis, Kelly JF, Aggarwal NT, Shah RC, Wilson RS., (2006). Neuropathology of Older Persons without Cognitive Impairment from Two Community-Based Studies. *Neurology* 66(12): 1837–1844.

Berridge, Craig W., and Barry D. Waterhouse, (2003). The Locus Coeruleus-Noradrenergic System: Modulation of Behavioral State and State-Dependent Cognitive Processes. *Brain Research. Brain Research Reviews* 42(1): 33–84.

Bird, Thomas D., (2008). Genetic Aspects of Alzheimer Disease. *Genetics in Medicine : Official Journal of the American College of Medical Genetics* 10(4): 231–239.

Calhoun, Michael E, and Peter R Mouton, (2001). Length Measurement: New Developments in Neurostereology and 3D Imagery. *Journal of Chemical Neuroanatomy* 21(3): 257–265.

Canter, Rebecca G., Jay Penney, and Li-Huei Tsai, (2016). The Road to Restoring Neural Circuits for the Treatment of Alzheimer's Disease. *Nature* 539(7628): 187–196.

Chan-Palay, V., and E. Asan, (1989). Alterations in Catecholamine Neurons of the Locus Coeruleus in Senile Dementia of the Alzheimer Type and in Parkinson's Disease with and without Dementia and Depression. *The Journal of Comparative Neurology* 287(3): 373–392.

Clark, Kelsey L., and Behrad Noudoost, (2014). The Role of Prefrontal Catecholamines in Attention and Working Memory. *Frontiers in Neural Circuits* 8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3986539/>, accessed June 5, 2017.

Coronas-Samano, Guillermo, Keeley L. Baker, Winston J. T. Tan, Alla V. Ivanova, and Justus V. Verhagen, (2016). Fus1 KO Mouse As a Model of Oxidative Stress-Mediated Sporadic Alzheimer's Disease: Circadian Disruption and Long-Term Spatial and Olfactory Memory Impairments. *Frontiers in Aging Neuroscience* 8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5108791/>, accessed January 16, 2017.

Craig, Laura A., Nancy S. Hong, and Robert J. McDonald, (2011). Revisiting the Cholinergic Hypothesis in the Development of Alzheimer's Disease. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 35(6): 1397–1409.

Davis, K. L., R. C. Mohs, D. Marin, Purohit DP, Perl DP, Lantz M, Austin G, Haroutunian V., (1999). Cholinergic Markers in Elderly Patients with Early Signs of Alzheimer Disease. *JAMA* 281(15): 1401–1406.

Drachman, D. A., and J. Leavitt, (1974). Human Memory and the Cholinergic System. A Relationship to Aging? *Archives of Neurology* 30(2): 113–121.

Farlow, M., S. I. Gracon, L. A. Hershey, Lewis KW, Sadowsky CH, Dolan-Ureno J. (1992). A Controlled Trial of Tacrine in Alzheimer's Disease. The Tacrine Study Group. *JAMA* 268(18): 2523–2529.

Garcia-Osta, Ana, and Cristina M. Alberini, (2009). Amyloid Beta Mediates Memory Formation. *Learning & Memory* 16(4): 267–272.

Gauthier, Serge, Howard H. Feldman, Lon S. Schneider, Gordon K Wilcock, Giovanni B Frisoni, Jiri H Hardlund, Hans J Moebius, Peter Bentham, Karin A Kook, Damon J Wischik, Bjoern O Schelter, Charles S Davis, Roger T Staff, Luc Bracoud, Kohkan Shamsi, John M D Storey, Charles R Harrington, Claude M Wischik, (2016). Efficacy and Safety of Tau-Aggregation Inhibitor Therapy in Patients with Mild or Moderate Alzheimer's Disease: A Randomised, Controlled, Double-Blind, Parallel-Arm, Phase 3 Trial. *Lancet (London, England)* 388(10062): 2873–2884.

Glabe, Charles G., (2008). Structural Classification of Toxic Amyloid Oligomers. *The Journal of Biological Chemistry* 283(44): 29639–29643.

Haass Christian, and Dennis J. Selkoe, (2007). Soluble Protein Oligomers in Neurodegeneration: Lessons from the Alzheimer's Amyloid Beta-Peptide. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 8(2): 101–112.

Habib, Ahsan, Darrell Sawmiller, and Jun Tan, (2016). Restoring Soluble Amyloid Precursor Protein α Functions as a Potential Treatment for Alzheimer's Disease. *Journal of Neuroscience Research*.

Huang, Dandan, Dan Liu, Jianzhong Yin, Tianyi Qian, Susan Shrestha, Hongyan Ni, (2016). Glutamate-Glutamine and GABA in Brain of Normal Aged and Patients with Cognitive Impairment. *European Radiology* 27(7): 2698–2705.

Iqbal, K., A. C. Alonso, C. X. Gong, Khatoon S, Singh TJ, Grundke-Iqbal I.,(1994). Mechanism of Neurofibrillary Degeneration in Alzheimer's Disease. *Molecular Neurobiology* 9(1–3): 119–123.

Itoh, A., A. Nitta, M. Nadai, Nadai M, Nishimura K, Hirose M, Hasegawa T, Nabeshima T., (1996). Dysfunction of Cholinergic and Dopaminergic Neuronal Systems in Beta-Amyloid Protein--Infused Rats. *Journal of Neurochemistry* 66(3): 1113–1117.

Jones, E. G., H. Burton, C. B. Saper, and L. W. Swanson, (1976). Midbrain, Diencephalic and Cortical Relationships of the Basal Nucleus of Meynert and Associated Structures in Primates. *The Journal of Comparative Neurology* 167(4): 385–419.

Karran, Eric, and Bart De Strooper, (2016). The Amyloid Cascade Hypothesis: Are We Poised for Success or Failure? *Journal of Neurochemistry* 139: 237–252.

Kempf, Martina, Albrecht Clement, Andreas Faissner, Gloria Lee, and Roland Brandt, (1996). Tau Binds to the Distal Axon Early in Development of Polarity in a Microtubule- and Microfilament-Dependent Manner. *Journal of Neuroscience* 16(18): 5583–5592.

Kitazawa, Masashi, Rodrigo Medeiros, and Frank M. LaFerla, (2012). Transgenic Mouse Models of Alzheimer Disease: Developing a Better Model as a Tool for Therapeutic Interventions. *Current Pharmaceutical Design* 18(8): 1131–1147.

Koch, Giacomo, Francesco Di Lorenzo, Sonia Bonni, Viola Giacobbe, Marco Bozzali Carlo Caltagirone and Alessandro Martorana, (2014). Dopaminergic Modulation of Cortical Plasticity in Alzheimer's Disease Patients. *Neuropsychopharmacology* 39(11): 2654–2661.

Leech, Robert, Salwa Kamourieh, Christian F. Beckmann, and David J. Sharp, (2011). Fractionating the Default Mode Network: Distinct Contributions of the Ventral and Dorsal Posterior Cingulate Cortex to Cognitive Control. *Journal of Neuroscience* 31(9): 3217–3224.

Leech, Robert, and David J. Sharp, (2014). The Role of the Posterior Cingulate Cortex in Cognition and Disease. *Brain* 137(1): 12–32.

Leissring, Malcolm A., Wesley Farris, Alice Y. Chang, Walsh DM, Wu X, Sun X, Frosch MP, Selkoe DJ., (2003). Enhanced Proteolysis of Beta-Amyloid in APP Transgenic Mice Prevents Plaque Formation, Secondary Pathology, and Premature Death. *Neuron* 40(6): 1087–1093.

Lian, Wenwen, Jiansong Fang, Lvjie Xu, Wei Zhou, De Kang, Wandi Xiong, Hao Jia, Ai-Lin Liu and Guan-Hua Du, (2017). DL0410 Ameliorates Memory and Cognitive Impairments Induced by Scopolamine via Increasing Cholinergic Neurotransmission in Mice. *Molecules (Basel, Switzerland)* 22(3).

Lisman, John, Anthony A. Grace, and Emrah Duzel, (2011). A NeoHebbian Framework for Episodic Memory; Role of Dopamine-Dependent Late LTP. *Trends in Neurosciences* 34(10): 536–547.

Magi, Simona, Pasqualina Castaldo, Maria Loredana Macrì, Marta Maiolino, Alessandra Matteucci, Guendalina Bastioli, Santo Gratteri, Salvatore Amoroso, and Vincenzo Lariccia, (2016). Intracellular Calcium Dysregulation: Implications for Alzheimer's Disease. *BioMed Research International* 2016: 6701324.

Martorana, Alessandro, and Giacomo Koch, (2014). Is Dopamine Involved in Alzheimer's Disease? *Frontiers in Aging Neuroscience* 6: 252.

MBF Bioscience, (2017), Stereology Solutions for Research, <http://www.mbfbioscience.com/stereology>.

McGowan, Eileen, Jason Eriksen, and Michael Hutton, (2006). A Decade of Modeling Alzheimer's Disease in Transgenic Mice. *Trends in Genetics: TIG* 22(5): 281–289.

Moreno-Castilla, Perla, Luis F. Rodriguez-Duran, Kioko Guzman-Ramos, Alejandro Barcenas-Femat, Martha L. Escobar, Federico Bermudez-Rattoni, (2016). Dopaminergic Neurotransmission Dysfunction Induced by Amyloid- β Transforms Cortical Long-Term Potentiation into Long-Term Depression and Produces Memory Impairment. *Neurobiology of Aging* 41: 187–199.

Muir, J. L., (1997). Acetylcholine, Aging, and Alzheimer's Disease. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior* 56(4): 687–696.

Nobili, Annalisa, Emanuele Claudio Latagliata, Maria Teresa Viscomi, Virve Cavallucci, Debora Cutuli, Giacomo Giacobazzo, Paraskevi Krashia, Francesca Romana Rizzo, Ramona Marino, Mauro Federici, Paola De Bartolo, Daniela Aversa, Maria Concetta Dell'Acqua, Alberto Cordella, Marco Sancandi, Flavio Keller, Laura Petrosini, Stefano Puglisi-Allegra,, Nicola Biagio Mercuri, Roberto Coccurello, Nicola Berretta and Marcello D'Amelio, (2017). Dopamine Neuronal Loss Contributes to Memory and Reward Dysfunction in a Model of Alzheimer's Disease. *Nature Communications* 8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5382255/>, accessed May 27, 2017.

NORMA Oficial Mexicana NOM-062- ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio, 2001. <http://publico.senasica.gob.mx/?doc=743>

NORMA Oficial Mexicana NOM-033- ZOO-1995, Sacrificio humanitario de los animales domésticos y silvestres, 1995. <http://www.cuautitlan.unam.mx/descargas/cicuae/normas/Norma033.pdf>

Oddo, Salvatore, Antonella Caccamo, Jason D. Shepherd, et al., Murphy MP, Golde TE, Kaye R, Metherate R, Mattson MP, Akbari Y, LaFerla FM., (2003). Triple-Transgenic Model of Alzheimer's Disease with Plaques and Tangles: Intracellular Abeta and Synaptic Dysfunction. *Neuron* 39(3): 409–421.

Palop, Jorge J., and Lennart Mucke, (2010). Amyloid- β Induced Neuronal Dysfunction in Alzheimer's Disease: From Synapses toward Neural Networks. *Nature Neuroscience* 13(7): 812–818.

Paxinos and Franklin's the Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates, George Paxinos, Keith Franklin; 4th Edition (2012), 360 págs. <https://www.elsevier.com/books/paxinos-and-franklins-the-mouse-brain-in-stereotaxic-coordinates/paxinos/978-0-12-391057-8>.

Perez, Sylvia E., Orly Lazarov, James B. Koprach, Er-Yun Chen, Virginia Rodriguez-Menendez, Jack W. Lipton, Sangram S. Sisodia and Elliott J. Mufson, (2005). Nigrostriatal Dysfunction in Familial Alzheimer's Disease-Linked APP^{swE}/PS1^{DeltaE9} Transgenic Mice. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 25(44): 10220–10229.

Perry, E. K., B. E. Tomlinson, G. Blessed, Bergmann K, Gibson PH, Perry RH, (1978). Correlation of Cholinergic Abnormalities with Senile Plaques and Mental Test Scores in Senile Dementia. *British Medical Journal* 2(6150): 1457–1459.

Portet, Florence, Nikolaos Scarmeas, Stephanie Cosentino, Elisabeth P. Helzner, and Yaakov Stern, (2009). Extrapyrarnidal Signs before and after the Diagnosis of Incident Alzheimer Disease in a Prospective Population Study. *Archives of Neurology* 66(9): 1120–1126.

Prince, Martin, Renata Bryce, Emiliano Albanese, Anders Wimo, Wagner Ribeiro, Cleusa P. Ferri, (2013). The Global Prevalence of Dementia: A Systematic Review and Metaanalysis. *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association* 9(1): 63–75.e2.

Purves, Augustine, Fitzpatrick, Neurociencia, Editorial Panamericana, 3a Edición, España, 2008.

Ranganath, Ajit, and Simon N. Jacob, (2016). Doping the Mind: Dopaminergic Modulation of Prefrontal Cortical Cognition. *The Neuroscientist: A Review Journal Bringing Neurobiology, Neurology and Psychiatry* 22(6): 593–603.

Romano Adele, Lorenzo Pace, Bianca Tempesta, Angelo Michele Lavecchia, Teresa Macheda, Gaurav Bedse, Antonio Petrella, Carlo Cifani, Gaetano Serviddio, Gianluigi Vendemiale, Silvana Gaetani, Tommaso Cassano, (2015).

Depressive-Like Behavior Is Paired to Monoaminergic Alteration in a Murine Model of Alzheimer's Disease. *International Journal of Neuropsychopharmacology* 18(4). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4360228/>, accessed March 22, 2017.

Ruiz-Pérez, Daniel, Carlota Largo, and Francisco García-Río, (2016). Aspectos técnicos y utilidades del trasplante pulmonar experimental murino. *Archivos de Bronconeumología* 52(12): 596–604.

Sato, Mizuho, Kazuma Murakami, Mayumi Uno, Yu Nakagawa, Sumie Katayama, Ken-ichi Akagi, Yuichi Masuda, Kiyonori Takegoshi and Kazuhiro Irie, (2013).

Site-Specific Inhibitory Mechanism for Amyloid B42 Aggregation by Catechol-Type Flavonoids Targeting the Lys Residues. *The Journal of Biological Chemistry* 288(32): 23212–23224.

Schultz, W., P. Apicella, and T. Ljungberg, (1993). Responses of Monkey Dopamine Neurons to Reward and Conditioned Stimuli during Successive Steps of Learning a Delayed Response Task. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 13(3): 900–913.

Smith, Y., and A. Parent, (1984). Distribution of Acetylcholinesterase-Containing Neurons in the Basal Forebrain and Upper Brainstem of the Squirrel Monkey (*Saimiri Sciureus*). *Brain Research Bulletin* 12(1): 95–104.

Spears, William, Matthew Furgerson, John Michael Sweetnam, Parker Evans, Marla Gearing, Marcus Fechheimer and Ruth Furukawa, (2014). Hirano Bodies Differentially Modulate Cell Death Induced by Tau and the Amyloid Precursor Protein Intracellular Domain. *BMC Neuroscience* 15: 74.

Takeuchi, Tomonori, Adrian J. Duszkiewicz, Alex Sonneborn, Patrick A. Spooner, Miwako Yamasaki, Masahiko Watanabe, Caroline C. Smith, Guillén Fernández, Karl Deisseroth, Robert W. Greene and Richard G. M. Morris, (2016). Locus Coeruleus and Dopaminergic Consolidation of Everyday Memory. *Nature* 537(7620): 357–362.

Torika, Nofar, Keren Asraf, Hagit Cohen, and Sigal Fleisher-Berkovich, (2017). Intranasal Telmisartan Ameliorates Brain Pathology in Five Familial Alzheimer's Disease Mice. *Brain, Behavior, and Immunity*. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0889159117301034>, accessed

Trabace, L., K. M. Kendrick, S. Castrignanò, M. Colaianna, A. De Giorgi, S. Schiavone, C. Lanni, V. Cuomo, S. Govoni, (2007). Soluble Amyloid Beta1-42 Reduces Dopamine Levels in Rat Prefrontal Cortex: Relationship to Nitric Oxide. *Neuroscience* 147(3): 652–663.

Van Dam, Debby, and Peter Paul De Deyn, (2017). Non Human Primate Models for Alzheimer's Disease-Related Research and Drug Discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery* 12(2): 187–200.

Vermeiren, Yannick, and Peter P. De Deyn, (2017). Targeting the Norepinephrinergic System in Parkinson's Disease and Related Disorders: The Locus Coeruleus Story. *Neurochemistry International* 102: 22–32.

Walsh, Dominic M., and Dennis J. Selkoe, (2007). A Beta Oligomers - a Decade of Discovery. *Journal of Neurochemistry* 101(5): 1172–1184.

Whitehouse, P. J., D. L. Price, A. W. Clark, J. T. Coyle, and M. R. DeLong, (1981). Alzheimer Disease: Evidence for Selective Loss of Cholinergic Neurons in the Nucleus Basalis. *Annals of Neurology* 10(2): 122–126.

Wilkins, Heather M., and Russell H. Swerdlow, (2016). Amyloid Precursor Protein Processing and Bioenergetics. *Brain Research Bulletin*.

Wischik, Claude M., Roger T. Staff, Damon J. Wischik, Bentham Peter, Murray Alison D. Storey John M.D., Kook Karin A., Harrington Charles R., (2015). Tau Aggregation Inhibitor Therapy: An Exploratory Phase 2 Study in Mild or Moderate Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease: JAD* 44(2): 705–720.

Wong, Philip C., Huaibin Cai, David R. Borchelt, and Donald L. Price, (2002). Genetically Engineered Mouse Models of Neurodegenerative Diseases. *Nature Neuroscience* 5(7): 633–639.

Zaborszky, L., and W.e. Cullinan, (1996). Direct Catecholaminergic-Cholinergic Interactions in the Basal Forebrain. I. Dopamine- β -Hydroxylase- and Tyrosine Hydroxylase Input to Cholinergic Neurons. *The Journal of Comparative Neurology* 374(4): 535–554.