



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

**Alteraciones de circuitos neuronales en un modelo transgénico que contiene
mutaciones en el gen de Presenilina**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE: MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:

GEORGINA ANAHÍ SALAS GALLARDO

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Siddhartha Mondragón Rodríguez
Instituto de Neurobiología UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

Dra. Sofía Yolanda Díaz Miranda
Instituto de Neurobiología UNAM

Dr. Octavio César García González
Facultad de Psicología UNAM

CIUDAD DE MÉXICO, JUNIO 2018



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.

Universidad Nacional Autónoma de México

Instituto de Neurobiología

Los miembros del Jurado certificamos que la tesis elaborada por: Georgina Anahí Salas Gallardo, cuyo título es: “**Alteraciones de circuitos neuronales en un modelo transgénico que contiene mutaciones en el gen de Presenilina**” 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

Dr. Adán Hernández Cortés

Secretario (Tutor)

Dr. Siddhartha Mondragón Rodríguez

Vocal

Dr. Luis Camilo Ríos

Suplente

Dra. Sofía Yolanda Díaz Miranda

Suplente

Dra. Angelina Rodríguez Torres

Aprobado por el Comité Académico

Coordinador del Programa

RESUMEN

ALTERACIONES DE CIRCUITOS NEURONALES EN UN MODELO TRANSGÉNICO QUE CONTIENE MUTACIONES EN EL GEN DE PRESENILINA

La Presenilina 1 (PS1) es el componente catalítico del complejo gamma secretasa y sus mutaciones han sido relacionadas con el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer (EA). En este proyecto identificamos la participación de la mutación M146V-PS1 en la alteración de circuitos hipocampales en un modelo de ratón (3xTgAD) de 30 días de edad. De manera interesante no se encontraron alteraciones conductuales dependientes de hipocampo sin embargo, se observó un incremento de la potencia en la actividad theta hipocampal, generada por las neuronas piramidales en las áreas CA1 y subiculum. A nivel molecular, estas neuronas piramidales se caracterizaron por contener a la proteína Tau hiperfosforilada en los sitios S396 y T231. Adicionalmente, nuestros datos evidenciaron un incremento de casi 5 veces en los niveles del Fragmento Carboxilo Terminal (FCT) de la N-cadherina y una disminución de la actividad de la cinasa Akt en el modelo 3xTgAD. En conjunto, nuestros datos sugieren un procesamiento deficiente del FCT de la N-cadherina por la M146V-PS1 lo que modifica la vía PI3K/Akt/ GSK3 β causando un incremento en los niveles de fosforilación de la proteína Tau alterando así la actividad theta del hipocampo.

ABSTRACT

ALTERATIONS OF NEURAL CIRCUITS IN A TRANSGENIC MODEL CONTAINING MUTATIONS IN THE PRESENILIN GENE

Presenilin 1 (PS1) is the catalytic component of the gamma secretase complex and its mutations have been linked to the development of Alzheimer's disease (AD). Here, we identified the role of the M146V-PS1 mutation in the hippocampal activity in a mouse model (3xTgAD) of 30 days of age. Interestingly, hippocampal-dependent behavioral changes were not found, however, an increase in hippocampal theta activity power was observed. Of relevance CA1 and subiculum areas pyramidal networks are responsible for theta rhythms generation. At the cellular level, these pyramidal neurons were characterized by containing the hyperphosphorylated Tau protein at sites S396 and T231. Additionally, our data evidenced an increase in the levels of the Carboxyl Terminal Fragment (CTF) of N-cadherin and a decrease in Akt kinase activity. Taken together, our data suggest a deficient processing of N-cadherin CFT by M146V-PS1, which modifies the PI3K / Akt / GSK3 β pathway causing an increase in phosphorylation levels of the Tau protein thus altering the theta activity of the hippocampus.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco de manera especial a las siguientes personas por su apoyo en la realización de este proyecto:

Dr. Fernando Peña Ortega

Dr. Benito Ordaz

M. en CF. Azucena Ruth Aguilar Vázquez

Dra. Erika M. Orta

M. en C. Leonor Casanova Rico

Guadalupe Amador Uribe

Dra. Gloria Alejandra Eugenia Castilla León

M.V.Z Martín García Servín

Dra. Deisy Gasca Martínez

Dr. Mark Brandon

Miembros del laboratorio C-01, Circuitos Neuronales

Agradezco a los miembros de mi Comité Académico por sus valiosas contribuciones y su entusiasmo en la realización de este proyecto:

Dra. Sofía Yolanda Díaz Miranda

Dr. Octavio César García González

A mi tutor:

Dr. Siddhartha Mondragón Rodríguez

A las siguientes instituciones por el apoyo brindado en el desarrollo del presente trabajo:

- Laboratorio de Circuitos Neuronales, Departamento de Neurobiología del Desarrollo y Neurofisiología, Campus Juriquilla, UNAM.
- Laboratorio de Neuromorfometría y desarrollo, Departamento de Neurobiología del Desarrollo y Neurofisiología, Campus Juriquilla, UNAM.
- Unidad de Análisis Conductual, Campus Juriquilla, UNAM.
- Bioterio, Campus Juriquilla, UNAM.
- Programa de Maestría en Ciencias (Neurobiología), UNAM.
- Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) No. De CVU/ No. De Becario: 770620/612275.
- Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) Beca mixta 2017.
- Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP), UNAM, 2017.
- Universidad McGill.
- Instituto Universitario de Salud Mental Douglas.
- Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) No. De Proyecto 269021 otorgado a Dr. Siddhartha Mondragón Rodríguez.
- Fundación Marcos Moshinsky, CONACyT 117 y 235789, DGAPA-UNAM IN202018 otorgados a Dr. Fernando Peña Ortega.

DEDICATORIAS

El presente trabajo es resultado de un esfuerzo común, proveniente de años atrás, realizado por mis padres. Sin su amor, su apoyo incondicional, noches de desvelo y sin su incansable trabajo, este proyecto hubiera sido sólo un sueño.

A mi hermano, mis abuelitos, mi familia.

A los ángeles que me cuidan desde arriba, y a mi Ángel que me cuida aquí en la Tierra.

A Dios.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1. PRESENILINA 1 (PS1)	2
2.2. ENFERMEDAD DE ALZHEIMER (EA)	4
2.2.1 MÉTODOS DIAGNÓSTICOS EN LA EA	6
2.2.2 BIOMARCADORES	6
2.2.2.1 BIOMARCADORES GENÉTICOS	6
2.2.2.2 BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS	7
2.2.2.3 BIOMARCADORES DE NEUROIMAGEN	7
2.2.3 MARCADORES HISTOPATOLÓGICOS DE LA EA	8
2.2.3.1 PLACAS DE β A	8
2.2.3.2 MARAÑAS NEUROFIBRILARES DE TAU	10
2.2.3.3 PROGRESIÓN DE MARAÑAS NEUROFIBRILARES DE TAU Y PLACAS EXTRACELULARES DE β A	13
2.3 EL HIPOCAMPO Y EL RITMO CEREBRAL THETA	15
2.4 MODELOS TRANSGÉNICOS Y ALTERACIONES EN ACTIVIDAD CEREBRAL	19
2.5 MUTACIONES EN PS1 Y SU POTENCIAL PAPEL EN LA AFECTACIÓN DE CIRCUITOS NEURONALES	20
3. JUSTIFICACIÓN	22
4. HIPÓTESIS	22
5. OBJETIVOS	22
5.1. OBJETIVO GENERAL	22
5.2. OBJETIVOS PARTICULARES	22

6. MATERIAL Y MÉTODOS	23
6.1. SUJETOS	24
6.2. PRUEBA CONDUCTUAL: NESTING	25
6.3. PRUEBA CONDUCTUAL: LABERINTO EN T	25
6.4. DISECCIÓN (PREPARACIÓN SEPTO-HIPOCAMPAL)	25
6.5. REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS	23
6.6. WESTERN BLOT	27
6.7. INMUNOFLUORESCENCIA Y MICROSCOPIA	27
6.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	27
7. RESULTADOS	28
7.1 EL GRUPO 3xTgAD NO PRESENTÓ ALTERACIONES A NIVEL DE FUNCIONES EJECUTIVAS A LOS 30 DÍAS DE EDAD	27
7.2. ESTANDARIZACIÓN DE LA PREPARACIÓN SEPTO-HIPOCAMPAL PARA EL REGISTRO DE LA ACTIVIDAD HIPOCAMPAL THETA	32
7.3. LA POTENCIA TOTAL EN LA BANDA DE THETA SE ENCONTRÓ AFECTADA EN EL MODELO 3xTgAD	34
7.4. EL GRUPO 3xTgAD PRESENTA NIVELES INCREMENTADOS DE FOSFORILACIÓN EN EL RESIDUO S396 DE LA PROTEÍNA TAU	36
7.5. LA PROTEÍNA TAU FOSFORILADA EN EL SITIO S396 SE LOCALIZA EN LA CAPA PIRAMIDAL DEL HIPOCAMPO	37
7.6. LA PROTEÍNA TAU SE ENCUENTRA HIPERFOSFORILADA EN MÁS DE UN SITIO Y SE LOCALIZA EN LA CAPA PIRAMIDAL DEL HIPOCAMPO	38
7.7. COMPARACIÓN DE LOS NIVELES DE FLUORESCENCIA EN LOS SITIOS DE FOSFORILACIÓN DE LA PROTEÍNA TAU: S396 Y THR231	40
7.8. EXISTEN NIVELES INCREMENTADOS DEL FCT DE LA N-CADHERINA EN EL RATÓN 3xTgAD	42

7.9. LA ACTIVIDAD DE LA CINASA Akt ESTÁ DISMINUIDA EN EL GRUPO 3xTgAD	43
8. DISCUSIÓN	45
9. CONCLUSIONES	49
10. REFERENCIAS	50
11. LISTA DE FIGURAS Y TABLAS	58

1. INTRODUCCIÓN

La Enfermedad de Alzheimer (EA), pertenece al tipo de enfermedades neurodegenerativas (Aggarwal et al., 2015), que se caracterizan por una disfunción cognitiva selectiva y por una pérdida neuronal asociada a proteínas que se acumulan de forma patológica en el cerebro (Kovacs, 2016). Estas proteínas le confieren su carácter histopatológico y se les identifica en el tejido cerebral de los pacientes como las Marañas Neurofibrilares de la Proteína Tau (MNFs) y las placas de la proteína beta amiloide (β A). Aunque no se conoce de manera precisa el proceso de formación de estos marcadores, sí se han relacionado con eventos moleculares específicos como: el daño oxidativo al material genético y anormalidades metabólicas (Mondragón-Rodríguez et al., 2010). Por otro lado, se han identificado mutaciones genéticas relacionadas con la EA en tres genes humanos: en la Presenilina 1 (PS1, más de 150 mutaciones), en la Presenilina 2 (PS2, 10 mutaciones) y en la proteína precursora amiloide (APP, 25 mutaciones) (De Strooper, 2007).

El deterioro a los procesos de memoria observado durante la EA es el resultado de cambios neurodegenerativos que se inician en la formación hipocampal y continúan como una red neuronal extendida que comprende al lóbulo temporal medial y el lóbulo parietal medial (Moodley et al., 2014). El hipocampo es una estructura cerebral localizada en el lóbulo temporal del cerebro, y está compuesto de una serie de capas, dentro de las cuales se ubica la capa piramidal que está conformada por células piramidales y se cree está implicada en la generación de una actividad cerebral eléctrica conocida como actividad theta (Schultz et al., 2014; Cruikshank et al., 2012).

Con la finalidad de estudiar la EA se han desarrollado modelos animales que expresan mutaciones relacionadas con esta enfermedad, de manera interesante en algunos de los estudios en estos modelos han reportado alteraciones en la actividad hipocampal theta (Mahar et al., 2016; Goutagny et al., 2013; Siwek et al., 2015).

Debido a que las mutaciones en el gen de la PS1 abarcan alrededor del 75 a 80% de las mutaciones relacionadas con la EA (Wu et al., 2012), y que se ha demostrado que estas mutaciones juegan un papel muy relevante en el procesamiento de proteínas que regulan tanto la actividad sináptica (la proteína β A) como importantes vías de señalización celular (Notch y N-cadherina) (Lu et al., 2014; Hardy et al., 2002;

Artavanis-Tsakonas et al., 1999; Fortini, 2002; Fannon et al. 1996; Huntley et al., 2002), el objetivo de este proyecto fue identificar la contribución de la mutación M146V en el gen de la PS1 en la alteración de los circuitos hipocampales de un modelo con tres mutaciones relacionadas con la EA: el ratón 3xTgAD, que posee además, las mutaciones: PPASwe, y Tau-P301L, que ofrece un contexto en el que se desarrollan tanto las placas de β A, como las Marañas Neurofibrilares de la proteína Tau (MNF) (Oddo et al., 2003).

2. ANTECEDENTES

2.1. PRESENILINA 1 (PS1)

La PS1 y su homólogo, Presenilina 2 (PS2) son proteínas de membrana evolutivamente muy conservadas (Golde et al., 2001). El gen que codifica para PS1 se encuentra en el cromosoma humano 14 (14q24.3), y fue identificado a través de un análisis genético realizado en familias con presencia de formas autosómicas dominantes de la EA (Wu et al., 2012). El gen de PS2, que se encuentra en el cromosoma 1 (1q42.2) fue identificado posteriormente por homología (Rogaev et al., 1995). Tanto el gen de PS1 (Figura 1), como el de PS2 están organizados en diez exones y sufren un proceso llamado empalme alternativo dependiente del tejido, por lo que su localización influye en sus patrones de expresión (Li et al., 2013). El gen de PS1 suele transcribirse de manera constante en el cerebro, mientras que la presencia de PS2 es mucho menor en este tejido, con excepción de su alta tasa de transcripción en el cuerpo caloso (Tandon et al, 2002; Hutton et al., 1996; Prihar et al., 1996). La PS1 es el centro catalítico del complejo de gamma (γ) secretasa y el ensamblaje de este complejo requiere la asociación de la PS1 con tres proteínas membranales adicionales que son: Nicastrina, APH (“Anterior Pharynx Defective”), y PEN2 (“Presenilin Enhancer 2”) (Dries et al., 2008; Spasic et al., 2008). Además, la PS1 posee nueve dominios transmembranales (DTMs), y dos residuos catalíticos de ácido aspártico localizados en los DTM6 y 7, que son requeridos para la hidrólisis del sustrato (Laudon et al., 2005).

El ensamblaje del complejo γ secretasa es acompañado por un paso de activación en el que la PS1 es endoproteolizada y convertida a un heterodímero formado por sus extremos N-terminal y C-terminal (PS1-FNT/PS1FCT) (Thinakaran et al., 1996; Kimberly et al., 2000; Wolfe et al., 1999). El complejo γ secretasa tiene dos

actividades catalíticas: una de ellas es endoproteolítica, mediante la cual se liberan dominios intracelulares de proteínas transmembranales tipo 1, y la otra es una actividad de carboxipeptidasa, la cual corta DTMs restantes del sustrato hasta la liberación del dominio final (Wolfe, 2013). Las interacciones entre los DTMs dentro de la PS1 y las moléculas con las que interactúan son esenciales para el ensamble de la γ secretasa y maduración, así como para el acoplamiento del sustrato y su procesamiento (Spasic et al., 2008).

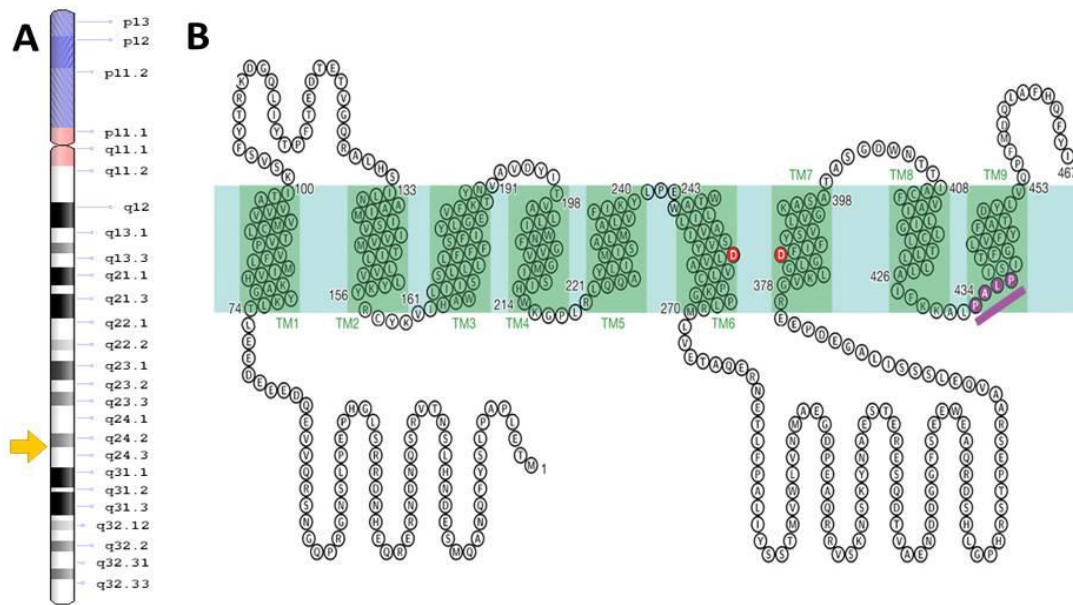


Figura 1. A. Cromosoma humano 14. El gen de la Presenilina 1 se señala con una flecha amarilla. **B.** Diagrama esquemático de la topología membranar de la PS1. Los nueve dominios transmembranales se observan en la banda color verde. Los residuos catalíticos de aspartato se resaltan en color rojo. La secuencia de reconocimiento de sustrato se muestra en color violeta. Tomado de (Li et al., 2013).

El complejo γ secretasa (Figura 2), escinde muchas proteínas de membrana de tipo I con papeles críticos en la función neuronal, tales como el receptor Notch, que tiene un papel crítico en gran variedad de eventos de señalización y en modificaciones que afectan el destino celular tanto en la embriogénesis como en la adultez (Artavanis-Tsakonas et al., 1999; Fortini, 2002) la N-cadherina, que presenta un papel vital en la unión de membranas pre y post sinápticas, en el crecimiento axónico, sinaptogénesis y en eventos de plasticidad sináptica como lo es la potenciación a largo plazo (Fannon et al. 1996; Huntley et al., 2002) y en el procesamiento de la proteína precursora amiloide (PPA) (Lu et al., 2014; Hardy et al., 2002).

La PPA es una proteína transmembranal implicada principalmente en el desarrollo de la EA (Tandon et al., 2002). La PPA, es precursora de la proteína β amiloide (β A) y ya que es conocido que las mutaciones en PS1 tienen implicaciones directas en la producción del β A, estas últimas han sido estudiadas como factores importantes en el desarrollo de la EA (Tandon et al., 2002).

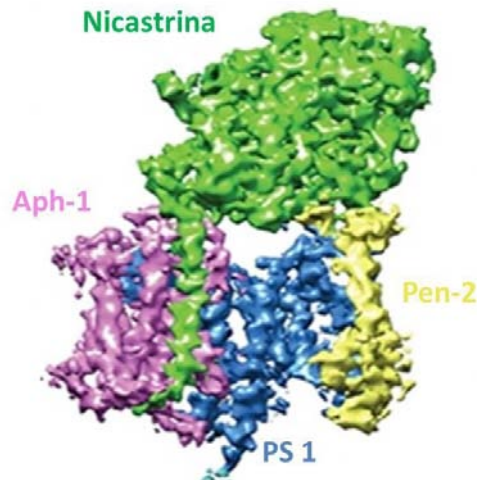


Figura 2. Representación tridimensional del complejo de gamma secretasa formado por: Nicastrina, Aph-1, Pen 2 y PS1. Tomado de (Lu et al., 2014).

2.2. ENFERMEDAD DE ALZHEIMER (EA)

La EA forma parte de un grupo de enfermedades denominado demencias entre las que también destacan la Demencia Vascular, la Demencia con cuerpos de Lewy y la Degeneración lobular frontotemporal, entre otras (Bhogal et al., 2013). Clínicamente la EA se caracteriza por una demencia que al inicio genera un fallo sutil y poco reconocido de la memoria, el cual se va agravando hasta incapacitar al paciente. Las características clínicas adicionales de este padecimiento incluyen confusión, agitación y alucinaciones y de manera ocasional se presenta un aumento del tono muscular, mioclono, incontinencia y mutismo (Bird, 1993). Durante el desarrollo de la EA, el deterioro de las funciones cognitivas conlleva a complicaciones mayores que se manifiestan tras pocos años de presentarse la enfermedad (Galasko et al., 1995).

La esperanza de vida para un paciente con EA puede variar entre 3 y 10 años desde el momento del diagnóstico (Brookmeyer et al., 2002; Helzner et al., 2008). La

muerte de los pacientes con EA es provocada por inanición, mala nutrición y neumonía (Bird, 1993). Actualmente, la EA es el tipo de demencia más común y según el Reporte Mundial de Alzheimer del año 2016, hasta este año había 47 millones de personas con algún tipo de demencia y se ha previsto que la cifra incremente a 131 millones de personas para el año 2050 (Soler et al., 2017; Prince et al., 2016). La demencia tiene además un impacto económico estimado en 818 mil millones de dólares, y se estima que en el año 2018 se convertirá en un billón de dólares (Prince et al., 2016).

El mayor factor de riesgo para la EA es la edad avanzada, por lo que los cuidados de salud se enfocan a personas de esta edad. Sin embargo, una minoría del 2 al 10% de los pacientes con EA presentan síntomas antes de alcanzar los 65 años de edad. A este subgrupo de la EA se le denomina EA de inicio precoz (EAIP), y cuando los síntomas inician después de los 65 años se denomina EA de inicio tardío (EAIT) (Gerritsen et al., 2016). Los pacientes que presentan EAIP, se han identificado como portadores de mutaciones en ciertos genes de relevancia para el desarrollo de la patología, tales como el gen de la PPA, y los genes que codifican PS1 y PS2, que como se mencionó anteriormente son proteínas transmembranales importantes en el procesamiento de la PPA para dar lugar a la generación de la proteína β A (Shen et al., 2007). Existen pocos estudios sobre la prevalencia de la EA en México, sin embargo, se ha determinado que en la población mayor de 20 años de edad, la prevalencia de la demencia es del 6.1 al 7.9%, lo que lo coloca como el quinto país con mayor prevalencia de la patología en América Latina (Llibre Rodríguez et al., 2008; Prince et al., 2008; Mejia-Arango et al., 2011). En este sentido, se han vuelto de vital importancia pruebas que permitan un diagnóstico y tratamiento durante etapas tempranas del desarrollo de la EA (Mondragón-Rodríguez et al., 2013). Hoy en día no existen tratamientos efectivos que detengan el desarrollo de la EA, debido a que los métodos de diagnóstico empleados no la detectan sino hasta un estado avanzado en donde las estrategias terapéuticas son menos eficaces (Mueller et al., 2005; Mondragón-Rodríguez et al., 2010).

2.2.1 MÉTODOS DIAGNÓSTICOS EN LA EA

Uno de los mayores retos a nivel de diagnóstico en la EA, es lograr que éste sea específico, ya que algunos otros tipos de demencia se le asemejan en cuanto a sintomatología y pueden confundir el diagnóstico (Chiba et al., 2016). Para la realización de un diagnóstico definitivo de la EA no sólo se deben presentar deficiencias cognitivas importantes, sino que éstas deben correlacionar con los hallazgos histopatológicos característicos en la autopsia (Mueller et al., 2005). En una persona viva, el posible o probable diagnóstico de la EA se realiza con base en la presencia de dos o más deficiencias cognitivas severas que afecten en gran medida el comportamiento diario del paciente (Mueller et al., 2005). Por lo tanto, si hasta ahora, el diagnóstico de la EA en etapas medias o avanzadas es complicado, su diagnóstico en etapas tempranas es incluso un reto mayor, porque existe evidencia de que los mecanismos patológicos moleculares de la EA comienzan incluso años antes de encontrarse las marcas histopatológicas y de la manifestación de daños cognitivos en el paciente (DeKosky et al., 2003). Durante las etapas iniciales de la EA el tratamiento podría ayudar a preservar las funciones cognitivas, es por esto que se ha mostrado gran interés en encontrar marcadores en esta etapa de la enfermedad.

2.2.2 BIOMARCADORES

Además de las mediciones clínicas y neurofisiológicas para el diagnóstico de la EA existen tres principales categorías de biomarcadores que pueden proveer información esencial: los genéticos, bioquímicos y los de neuroimagen (Mueller et al., 2005).

2.2.2.1 BIOMARCADORES GENÉTICOS

Existen estudios en gemelos que han mostrado una herencia de la EA de alrededor de un 60%, lo anterior sugiere que los factores genéticos juegan un papel muy importante en el desarrollo de esta patología (Bergem et al., 1997). Como se mencionó, se han identificado mutaciones en los genes de la PPA, y los genes de PS1 y PS2 que contribuyen al desarrollo de la EA (Tandon et al., 2003). Se sabe que las mutaciones en PS1 tienen implicaciones directas en la producción del β A (Tandon et al., 2002): la mutación de dos residuos de aspartato altamente conservados en PS1 (Asp257 y Asp385), inhibe la actividad de la γ secretasa y de esta manera se disminuye la

liberación del β A (Wolfe et al., 1999), además, cuando se encuentran las mutaciones D257A ó D385A en PS1, ésta se integra en menor proporción al complejo de la γ secretasa (Yu et al., 2000). Una de las consecuencias directas de las mutaciones de la PS1 como la A79V, I143T, A231V y C263, es el aumento en el cociente β A42/ β A40, siendo el β A42 más propenso a la polimerización y a ser neurotóxico (Kuperstein et al., 2010), además, participa en mayor proporción en la formación de placas de β A (marcador histopatológico de la EA) en la corteza asociativa y sistema límbico, generando una respuesta inflamatoria, estrés oxidativo y afectación de los circuitos neuronales (Palop et al., 2010).

2.2.2.2 BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS

Los biomarcadores bioquímicos surgieron desde la identificación de algunas moléculas claves en el desarrollo de la EA tales como la proteína Tau y la proteína beta amiloide (β A) (Mueller et al., 2005). Existen básicamente dos principales grupos: los biomarcadores específicos para el proceso de la EA y biomarcadores no específicos, que miden epifenómenos de la evolución de la patología tales como inflamación o estrés oxidativo (Mueller et al., 2005). Entre los específicos se encuentra la determinación de la proteína β A en el líquido cefalorraquídeo (LCR) ya que se han encontrado niveles anormales de ésta en pacientes con EA de la variedad hereditaria, sin embargo, los pacientes que presentan la variedad esporádica de la EA presentan rangos amplios de β A en el LCR que se superponen con los valores detectados en sujetos control, lo que disminuye su utilidad como biomarcador (Irizarry, 2004). Otra proteína que ha sido blanco de estudio como potencial biomarcador de la EA es la proteína Tau, sin embargo, los niveles de esta proteína también son afectados en otras patologías asociadas a la neurodegeneración, por lo que su valor como posible biomarcador de la EA se encuentra limitado (Hampel et al., 2004).

2.2.2.3 BIOMARCADORES DE NEUROIMAGEN

En cuanto a los biomarcadores de neuroimagen existen dos categorías principales: la imagen estructural, que incluye la tomografía asistida por computadora (CT) y la imagen por resonancia magnética (MRI). La segunda categoría es la imagen funcional, que incluye la tomografía de emisión de un fotón (SPECT) y la tomografía por emisión de

positrón (PET), estas técnicas basadas en neuroimagen detectan anomalías metabólicas en el tejido asociadas con neurodegeneración (Mueller et al., 2005), en este sentido se ha desarrollado la exploración por PET con una nueva radiosonda (C-11 PIB) con la que se han logrado tomar imágenes de la acumulación de placas de beta amiloide en el cerebro vivo, sin embargo, la heterogeneidad en la conducta, la interpretación de la prueba y la falta de umbrales definidos no permiten su uso como una herramienta de utilidad (Zhang, 2014).

2.2.3 MARCADORES HISTOPATOLÓGICOS DE LA EA

2.2.3.1 PLACAS DE β A

El estudio histológico del tejido cerebral de los pacientes revela dos marcas características de esta patología: placas extracelulares constituidas de la proteína β A y las MNF compuestas por la proteína Tau hiperfosforilada que son localizadas intracelularmente, (Figura 3) (Lue et al., 1999; Grundke-Iqbal et al., 1986; Galvan et al., 2001; Mondragón-Rodríguez et al., 2008). Es considerado que un exceso en los niveles de la proteína β A es uno de los principales detonadores de la disfunción y degeneración neuronal que se presentan en la EA (Thinakaran et al., 2008). La proteína β A está formada por 38-43 aminoácidos y es el producto del procesamiento de la PPA, esta proteína sufre una secuencia de rupturas catalíticas llevadas a cabo por los complejos enzimáticos: β secretasa y γ secretasa, cuya composición se mencionó anteriormente (Golde et al., 2001). El sitio blanco para otro complejo enzimático que actúa sobre la PPA (α secretasa) se encuentra dentro de la secuencia de la proteína β A, por lo que así su acción impide la formación de la proteína β A (Chow et al., 2010). El fragmento amino terminal generado a través de la acción de la α o β secretasa es llamado PPA secretado (sPPA) α o β , según el complejo que les dio origen, mientras que los fragmentos carboxilo terminales (CFT, por sus siglas en inglés) generados por la α y β secretasa son llamados CFT83 y CFT99, respectivamente (Obregon et al., 2012). El procesamiento de estos CFT por el complejo de la γ secretasa resulta en la generación de p3 y β A, respectivamente, además de un fragmento remanente unido a la membrana plasmática conocido como Dominio Intracelular de la PPA (APP Intracelular Domaine, AICD, por sus siglas en inglés) (Chow et al., 2010).

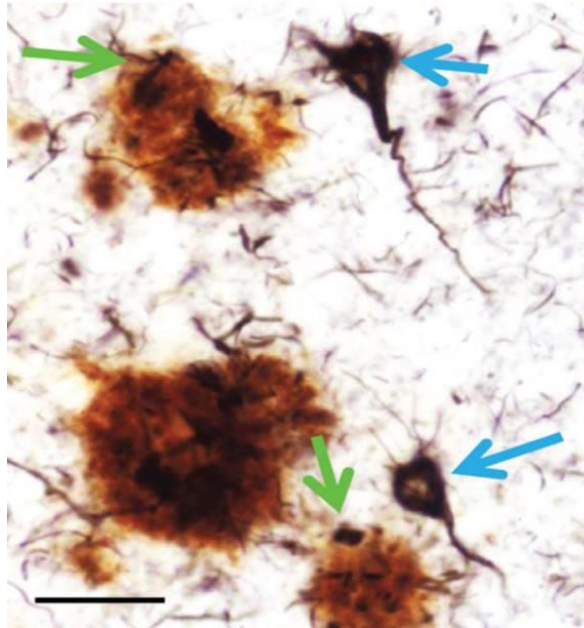


Figura 3. Fotomicrografía de una sección de la neocorteza cerebral de un cerebro perteneciente a un paciente con EA teñido empleando inmunohistoquímica de doble marcaje para β A (Café rojizo) y proteína tau (negro). Las placas de β A (señaladas en flechas verdes), tienen forma casi esférica y se encuentran a nivel extracelular, mientras que las MNFs (señaladas en flechas azules) se desarrollan de manera intracelular. Escala 50 μ m. Tomado de (Nelson et al., 2012).

La proteína β A hasta hace unos años era considerada patológica, y el rol que tenía en condiciones fisiológicas no estaba claro. A nivel experimental, se ha descrito que la proteína β A está implicada en procesos fisiológicos de memoria y aprendizaje en animales jóvenes y sanos (Morley et al., 2010). Otros hallazgos destacan el papel de la proteína β A en el control de la actividad sináptica (Kamenetz et al., 2003). Se ha reportado que la actividad hipocámpal evocada en rebanadas de cerebro incrementa la producción de β A mediante el incremento del transporte de PPA hacia los sitios de acción del complejo β secretasa en la membrana. Lo anterior promueve la formación de β A, pero también incrementa la formación de otros fragmentos como AICD, los cuales también podrían modular la actividad sináptica (Ma et al., 2007). Con base en lo anterior la importancia de la proteína β A en condiciones fisiológicas es clara, sin embargo, es conocido que la patogénesis de la EA podría relacionarse con el procesamiento

proteolítico anormal de la PPA, que genera agregados de β A insolubles (Shin et al., 2010). Estos oligómeros pueden alcanzar concentraciones del orden de nanomolar y adsorberse a receptores tanto neuronales como gliales. Los oligómeros se internalizan y se pliegan para después formar fibras; posterior a esto conforman las placas de β A (Seeman et al., 2011). Se ha encontrado inflamación en tejidos cerebrales de pacientes con EA, la cual se ha relacionado con una activación de las proteínas del complemento generada por la presencia de las placas de β A (Rogers et al., 1992). Adicionalmente, se ha descrito que la formación de monómeros y oligómeros de β A afecta la conexión neuronal, aunque el mecanismo no ha sido elucidado, una de las principales hipótesis gira alrededor de la modificación y alteración de procesos de plasticidad sináptica (asociados a mecanismos de formación de memoria) conocidos como depresión a largo plazo (LTD) y la inhibición de su contraparte, la potenciación a largo plazo (LTP), lo que se podría traducir como potencial efector del daño detectado a nivel de la actividad cerebral (Mucke et al., 2012; Mondragon-Rodriguez et al., 2012).

2.2.3.2 MARAÑAS NEUROFIBRILARES DE TAU

Como se mencionó, otra marca histopatológica de la EA son las MNFs constituidas principalmente por la proteína Tau (Figura 3). La proteína Tau es conocida por participar en la regulación de la estabilidad y dinámica de los microtúbulos (Timm et al., 2006; Yu et al., 2006) y fue descubierta casi simultáneamente en los Estados Unidos y en Europa como una proteína que mejora la eficiencia de la tubulina para formar microtúbulos en el cerebro (Cleveland et al., 1977). El gen humano que codifica para la proteína Tau se localiza en el cromosoma 17, ocupa alrededor de 100 kb y contiene al menos 16 exones (Figura 4) (Kimura et al., 2014). Existe una única región de exón no traducida siguiendo a la región 5' rica en GC. Por encima de este exón hay numerosas secuencias de ADN que contienen sitios de unión consenso para factores de transcripción promiscuos tales como AP2 o SP1. La proteína Tau se expresa en neuronas (Avila et al., 2004). El gen de Tau es transcrito a ARN nuclear, que mediante un proceso de empalme alternativo da lugar a distintas especies de ARN mensajero (mARN). La traducción de estos distintos mARNs resulta en la producción de diferentes isoformas de la proteína Tau, con distinto número de exones que es característica en el neurodesarrollo (Avila et al., 2004). Un gran número de polipéptidos de Tau aparecen al

fraccionar proteínas de extractos de cerebros mediante electroforesis. Algunos de estos polipéptidos se generan mediante empalme alternativo de ARN (Goedert et al., 1989; Himmler; 1989) y otros mediante modificaciones postraduccionales como la fosforilación (Baudier et al., 1987; Garcia de Ancos et al., 1993).

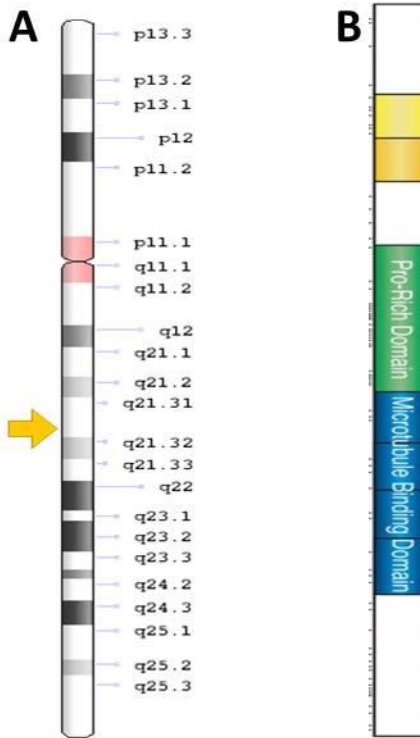


Figura 4. A. Cromosoma humano 17. El gen de la proteína Tau se señala con una flecha amarilla.**B.** Esquema de Proteína Tau. Inserciones N-terminal resaltadas en color amarillo. Dominio rico en prolina resaltado en verde. Dominio de unión a microtúbulos en color azul. Tomado de (Kimura et al., 2014).

El procesamiento de la proteína Tau durante la EA es particular, porque presenta tres modificaciones de tipo postraduccionales: fosforilación, escisión y cambios conformacionales, los cuales se han propuesto como eventos que promueven a la proteína hacia un estado patológico (Mondragón-Rodríguez et al., 2008). No obstante, la fosforilación de la proteína Tau se ha postulado como uno de los primeros eventos que aparece en estadios muy tempranos durante el desarrollo de la EA (Mondragón-Rodríguez et al., 2014).

Referente a la fosforilación, la proteína Tau puede ser fosforilada en más de 45 sitios, la mayoría en la región rica en prolina (Región-P, entre los residuos 172-251) y

en la región C terminal por distintas cinasas, entre ellas la cinasa glicógeno sintetasa 3β (GSK3 β), cinasa 5 dependiente de ciclina (Cdk5), JNK y la cinasa reguladora asociada a microtúbulos (MARK) (Hanger et al., 2009; Dolan et al., 2010). La fosforilación de Tau por GSK3 β y Cdk5 afecta las interacciones entre Tau y los microtúbulos, reduciendo la afinidad de los microtúbulos por Tau: la fosforilación del sitio Ser214 por la PKA genera un efecto similar (Wagner et al., 1996; Schneider et al., 1999). De manera notable, la fosforilación de las serinas dentro del dominio Lys-Xaa-Gly-Ser (KXGS) de los dominios de unión a microtúbulos (MTBDs) de la proteína Tau induce un fuerte efecto negativo en la interacción de la proteína Tau con los microtúbulos, la cinasa que fosforila estos sitios es MARK (Drewes et al., 1997). Además, la fosforilación modula el funcionamiento de la proteína Tau y la proteína Tau altamente fosforilada es menos eficiente para promover la polimerización y estabilización de los microtúbulos (Avila et al., 2004).

Como se mencionó, las MNFs están compuestas por ramilletes de filamentos anormales, constituidos por la proteína Tau anormalmente fosforilada (Brion, 1998). Éstos se acumulan alrededor del núcleo, además de acumularse en dendritas y en axón (Avila et al., 2004). Estos filamentos muestran constricciones regulares y han sido descritas como dos filamentos entrelazados de forma helicoidal entre sí, y a estos se les conoce como filamentos helicoidales pareados (PHF, por sus siglas en inglés: Paired Helical Filaments) (Barghorn et al., 2004). Pueden distinguirse diversos estados de MNFs según su morfología, el estado “premaraña” se caracteriza por la acumulación de tau fosforilada en el compartimento somatodendrítico, sin que exista la formación de PHF (Baner et al., 1989; Braak et al., 1994). En el siguiente estado, algunos bastones inmunorreactivos de Tau aparecen en soma y dendritas. Las clásicas MNFs están hechas de ramilletes empacados que llenan una parte del cuerpo celular y que se extienden hacia las dendritas. Las marañas extracelulares, que reflejan pérdida neuronal (Cras et al., 1995) permanecen por un largo periodo como resultado de su resistencia parcial a la proteólisis (Bondareff, 1994; Brion, 1998).

2.2.3.3 PROGRESIÓN DE MARAÑAS NEUROFIBRILARES DE TAU Y PLACAS EXTRACELULARES DE β A

La progresión del β A durante el desarrollo de la enfermedad es poco predecible, a pesar de esto se ha realizado una clasificación en tres etapas: en la etapa A, se encuentran depósitos amiloides en las porciones basales de los lóbulos frontal, temporal y occipital; en la etapa B, se encuentra una afectación de todas las áreas isocorticales de asociación, y la formación hipocampal se encuentra parcialmente afectada; y en la etapa C, donde además de las afectaciones anteriores se encuentran depósitos en la capa molecular del cerebelo y el núcleo subcortical, así como el cuerpo estriado, el tálamo, hipotálamo y núcleo subtalámico (Braak et al., 1991).

Existen un gran número de estudios clinicopatológicos que han establecido que la carga amiloidea (placas totales de β A, placas de núcleo denso o placas neuríticas) no correlaciona con la severidad ni con la duración de la EA (Hyman et al., 1993; Bierer et al., 1995; Giannakopoulos et al., 2003; Ingelsson et al., 2004; Gomez-Isla, 1997). De hecho, en una región de acumulación temprana de β A, como lo es la corteza temporal de asociación, la carga amiloidea alcanza un estado estacionario poco después del inicio de que se presenten los síntomas cognitivos o incluso en la fase preclínica de la EA (Ingelsson et al., 2004; Serrano-Pozo et al., 2011), y el tamaño de las placas tampoco incrementa de forma significativa a la par de la progresión de la EA (Hyman et al., 1993; Serrano-Pozo et al., 2011). Lo anterior respalda la hipótesis que la proteína β A tiene una pobre utilidad como posible biomarcador del diagnóstico y la progresión de la EA.

Por otro lado, durante la progresión de la EA, las MNF de Tau exhiben un patrón común (Figura 5), que ha permitido el establecimiento de seis etapas según los sitios anatómicos en los que se encuentre esta lesión (Serrano-Pozo et al., 2011). Según la clasificación de Braak et al., 1991 las primeras MNFs aparecen de manera sistemática en la región transentorrinal (etapa I) junto con la corteza entorrinal propiamente dicha, seguida por la región CA1 del hipocampo (etapa II). El hipocampo es un área del cerebro que posee una importancia crítica para procesos de aprendizaje y memoria, esta estructura es vulnerable al daño en etapas tempranas de la EA (Mu et al., 2011). A continuación, las MNFs se desarrollan y acumulan en estructuras límbicas tales como el

subículo de la formación del hipocampo (etapa III) y la amígdala, tálamo y el Claustrum (etapa IV). Por último, las MNFs se extienden a todas las áreas isocorticales (etapa isocortical), con afectación anterior y más severa en las áreas asociativas (etapa V) que en las áreas sensoriales primarias, motoras y visuales (etapa VI). Puede ocurrir una afectación grave del estriado y la sustancia negra durante la fase isocortical tardía. Este patrón en etapas se correlacionó con los niveles próximodistales de las arterias hemisféricas principales, lo que plantea la posibilidad de que este efecto sea mediado por la transmisión de volumen del líquido cefalorraquídeo en el cerebro (Papp et al., 2013).

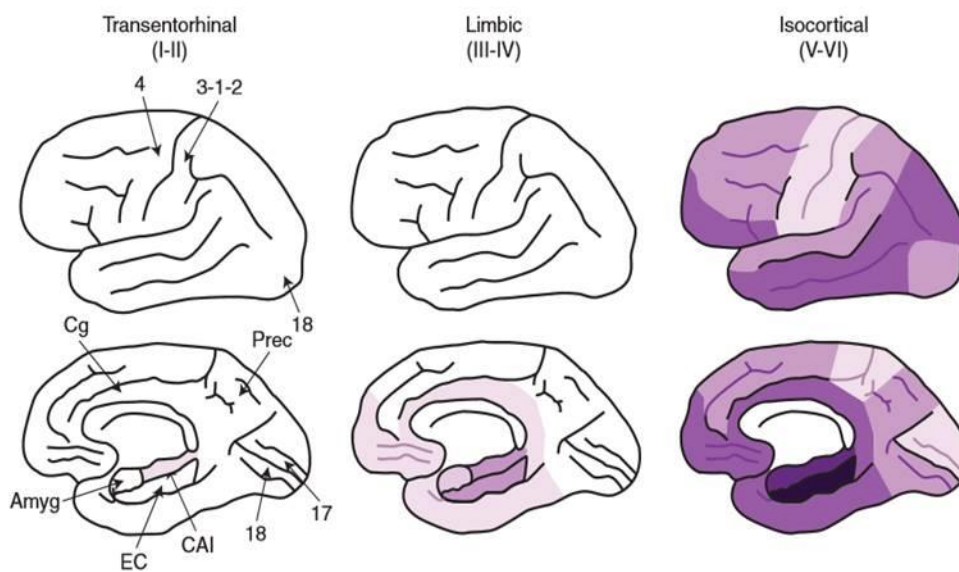


Figura 5. Patrón espaciotemporal de la degeneración neurofibrilar. Las áreas sombreadas indican la distribución de las MNFs, se representan las densidades con colores más intensos. Amyg=Amígdala; EC=Corteza Entorrinal; CA1= área del hipocampo; Cg=Corteza cingulada; 4=Corteza motora primaria; 3-1-2=Corteza sensitiva primaria; 17=Corteza visual primaria 18=Corteza visual de asociación (Serrano-Pozo et al., 2011).

Varios estudios de diferentes grupos han revelado que la cantidad y la distribución de las MNFs correlacionan en gran medida con la severidad y duración de la demencia (Bierer et al., 1995; Gomez-Isla, 1997; Giannakopoulos et al., 2003; Ingelsson et al., 2004). De hecho, el inicio del impedimento de la memoria episódica característica de la EA se explica por el aislamiento de las estructuras del lóbulo temporal medial de la isocorteza de asociación y el núcleo subcortical causado por la degeneración neurofibrilar. Después la afectación de áreas isocorticales de asociación

de orden superior contribuye al impedimento de dominios cognitivos adicionales, incluyendo una disfunción ejecutiva (corteza prefrontal), apraxias (corteza parietal), y déficits en la navegación visuoespacial (corteza occipitoparietal); visuoperceptivos (corteza occipitotemporal), y de memoria semántica (corteza temporal anterior), dando lugar al síndrome de demencia característico de la EA. Por otro lado, la afectación tardía de las áreas isocorticales motoras, sensoriales y visuales primarias, explica la escasa afectación de las áreas motoras, sensoriales y visuales (Hyman et al., 1984; Arnold et al., 1991; Braak et al., 1991).

En resumen, a diferencia de la progresión de la proteína β A durante el curso de la EA, las MNFs conformadas por la proteína Tau fosforilada son un mejor marcador de la progresión de la patología, sin embargo, el hallazgo de estas lesiones se ha reportado cuando ya existen también alteraciones a nivel cognitivo (Bierer et al., 1995; Giannakopoulos et al., 2003), por lo que el tratamiento no podrá revertir estas alteraciones. Por otro lado es importante destacar que el hallazgo de la proteína Tau hiperfosforilada, no sólo se correlaciona con la evolución de la EA sino que también con otras patologías tales como Síndrome de Down, la enfermedad de Pick y la enfermedad de Parkinson (Probst et al., 1996; Mondragón-Rodríguez et al., 2008; Lei et al., 2010).

2.3 EL HIPOCAMPO Y EL RITMO CEREBRAL THETA

El hipocampo es una región del cerebro localizada en el lóbulo temporal y derivada de la región medial del telencéfalo (Figura 6). La formación hipocampal es considerada como la principal estructura implicada en la generación del ritmo theta, que se ha considerado como la actividad electroencefalográfica mejor sincronizada que se registra en el cerebro de los mamíferos a frecuencias de 2 a 12 Hz (Cruikshank et al., 2012; Kowalczyk et al., 2013; Bohbot et al., 2017). Esta actividad se relaciona de manera experimental con procesos como comportamiento durante la vigilia y fase REM del sueño (Meador et al., 1991; Cantero et al., 2003), navegación espacial activa (Kahana et al., 1999; Caplan et al., 2003), y la memoria de trabajo (Raghavachari et al., 2001). El hipocampo forma parte del sistema límbico y se organiza anatómicamente en el Cuerno de Amón, que a su vez se divide en las áreas CA1, CA2 y CA3, y el giro dentado (Hernández et al., 2015; Shepherd et al., 2006) (Figura 6). Las células principales del

hipocampo son las células piramidales, su soma forma la capa piramidal. Existen otras áreas hipocampales que están conformadas de las diferentes partes de las neuronas piramidales, en esencia, la superficie del hipocampo que limita con el lumen ventricular está formada por los axones de las células piramidales y es llamada *alveus*. Entre ésta y la capa de células piramidales, el *stratum oriens* contiene las dendritas basales de las células piramidales así como distintos tipos de interneuronas, mientras que la región superficial de la capa piramidal (hacia la fisura hipocampal) contiene las dendritas apicales de las células piramidales y ciertas interneuronas, esta región ha sido dividida en 1) *stratum lucidum* 2) *stratum radiatum*, y 3) el *stratum lacunosum-moleculare* correspondiente a la porción más superficial (adyacente a la fisura hipocampal) de esta región (Schultz et al., 2014). Las dendritas apicales de las neuronas piramidales constituyen el *stratum radiatum*, mientras que el *stratum lacunosum-moleculare* contiene las terminaciones de estas dendritas. En el polo opuesto, las dendritas basales de las neuronas piramidales se ramifican en el *stratum oriens*. En el *stratum lucidum* del campo 3 (CA3), las fibras musgosas (FM) viajan y forman sinapsis con las dendritas proximales justo encima de la capa celular piramidal de CA3.

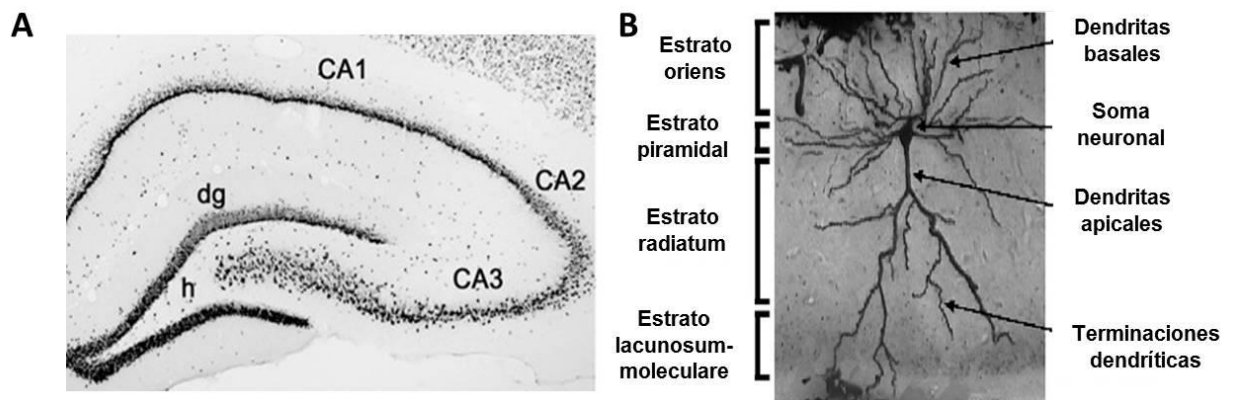


Figura 6. A. Corte coronal de hipocampo mostrando las regiones del Cuerno de Amón (CA1, CA2 y CA3) y Giro Dentado (dg). **B.** Región hipocampal CA1 con tinción de Golgi, mostrando una neurona piramidal. Se muestran los distintos estratos y el contenido celular de los mismos, tomado de (Shepherd et al., 2006).

En el hipocampo humano, una fracción de las FM viajan también dentro de la capa piramidal de CA3. En las regiones de CA2 y CA1 no se presenta *stratum lucidum*,

por lo que no se recibe aferencias de las FM. El sello distintivo de las neuronas CA3 es que sus dendritas proximales se ponen en contacto con las FM que corresponden a los axones de las células granulares dentadas (Schultz et al., 2014). Las FM atraviesan el *stratum lucidum* por encima de la capa de células piramidales CA3, estas células envían sus proyecciones hacia afuera del hipocampo a través de la fimbria y hacia CA1. En CA1, estas proyecciones provenientes del CA3 son llamadas colaterales de Schaffer, y terminan en el *strata radiatum* y *oriens*, formando sinapsis “*en passant*” sobre las dendritas apicales de las neuronas piramidales (Amaral et al., 1989). La proyección de la vía perforante desde la corteza entorrinal al giro dentado viaja, en parte, en el *stratum lacunosum-moleculare* del hipocampo y hace sinapsis sobre las dendritas apicales distales de las células piramidales del hipocampo (Figura 7). La región CA2 tiene una capa piramidal relativamente compacta y estrecha. En preparaciones de hipocampo humano, los bordes de CA2 son difíciles de establecer.

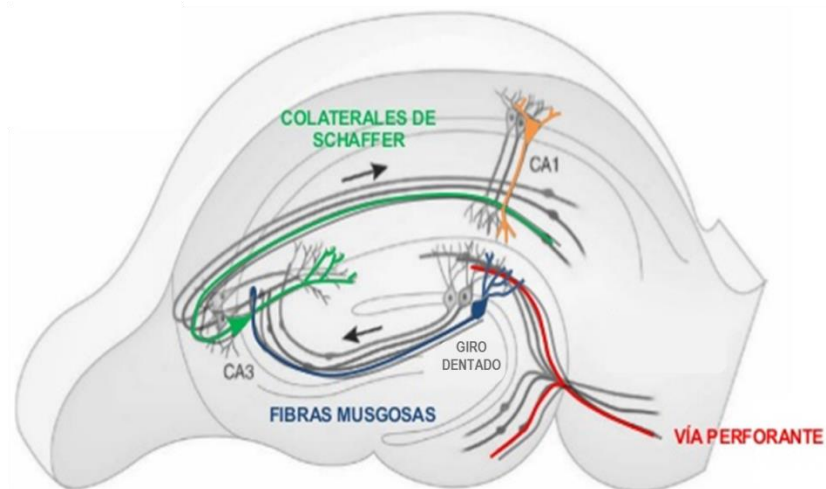


Figura 7. Esquema de los circuitos hipocampales. Rojo: vía perforante procedente de la Corteza Entorrinal; azul: Fibras musgosas que viajan desde el giro dentado hasta CA3; verde: Colaterales de Schaffer que se originan en CA3 y proyectan a CA1.

Filogenéticamente, CA1 es una subárea progresiva del hipocampo (Stephan et al., 1983), la capa piramidal de CA1 se adelgaza y se vuelve más heterogénea en humanos y en monos a comparación de esta capa en roedores (Schultz et al., 2014). Con base en estudios pigmento arquitectónicos, la capa piramidal de CA1 se puede subdividir en una capa interna y una externa (Braak, 1974). La capa piramidal de CA1

se encuentra sobrepuesta de manera oblicua al subíulum (Figura 6) (Schultz et al., 2014), y es considerada como la principal sub-estructura del hipocampo implicada en la generación del ritmo theta (Cruikshank et al., 2012; Kowalczyk et al., 2013).

El hipocampo recibe múltiples aferencias (Figura 8), entre ellas, las del núcleo septal medial (formado por el septum medial y la banda diagonal de Broca) que aportan las aferencias colinérgicas y GABAérgicas más importantes (Colom, 2006; Mesulam et al., 1983). Este conjunto es fundamental para la generación de la actividad theta en el hipocampo, no obstante el mecanismo por el cual lo consiguen no está del todo claro. Uno de los modelos propuestos sugiere que las neuronas colinérgicas del núcleo septal medial transmiten una despolarización sostenida de las neuronas piramidales de CA1 y CA3 en el hipocampo (Mondragón Rodríguez et al., en preparación), mientras que las neuronas GABAérgicas del núcleo septal medial inhiben de manera rítmica a las interneuronas GABAérgicas hipocampales, que a su vez, son el marcapasos de las neuronas piramidales del hipocampo (Manseau et al., 2008).

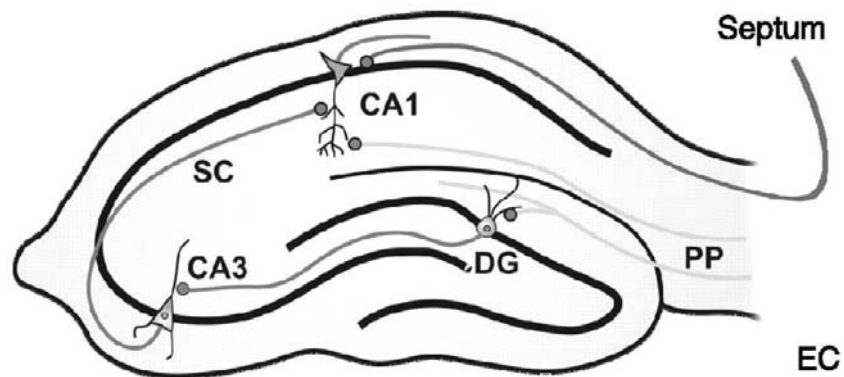


Figura 8. Esquema de las áreas hipocampales y sus aferencias. SC=Subíulum; DG=Giro Dentado; EC=Corteza Entorrinal, tomado de (Biel et al., 2009).

Hasta hace poco se consideraba que las únicas aferencias de la región septal medial al hipocampo eran GABAérgicas y colinérgicas, no obstante se ha encontrado que hay una tercera aferencia proveniente de la región septal medial compuesta por neuronas de tipo glutamatérgicas (Colom et al., 2005). De manera importante, se ha observado que lesiones en el septum medial pueden generar afecciones similares a las que se presentan cuando el hipocampo es lesionado de manera directa (Vann et al., 2008; Olton et al., 1982; Rawlins et al., 1985; Givens et al., 1990), lo que reafirma la

importancia de las aferencias del núcleo septal medial al hipocampo (Manseau et al., 2008).

Se ha descrito mediante técnicas de optogenética la relevancia de un grupo de interneuronas hipocampales que expresan el marcador de Parvalbúmina (PV+), estas interneuronas inhibitorias controlan poderosamente la red de las células piramidales del hipocampo y así la generación de ritmo theta, mientras que la el abatimiento en la actividad de este grupo de interneuronas es capaz de abatir este ritmo (Amilhon et al., 2015). Estos resultados demuestran así un papel fundamental de interneuronas PV+ para la sincronización de las células piramidales y la emergencia de la actividad theta hipocampal intrínseca.

El ritmo theta es característico del hipocampo, sin embargo también es posible encontrarlo en otras estructuras cerebrales como la corteza cerebral (Hori et al., 2013), incluso se ha investigado su alteración en distintas enfermedades como el Transtorno del Espectro Autista (Endres et al., 2017), la Esquizofrenia (Basar-Eroglu et al., 2008) y de manera especial se ha investigado sus alteraciones en la EA (Pascal Hot et al., 2011, Scott et al., 2016).

2.4 MODELOS DE RATONES TRANSGÉNICOS Y ALTERACIONES EN ACTIVIDAD CEREBRAL

Se han desarrollado diversos modelos de ratones transgénicos que se caracterizan por tener mutaciones en genes implicados con la EA. El grupo de Mahar en el 2016, empleó el ratón transgénico CRND8, que contiene dos mutaciones en PPA: la mutación sueca KM670/671NL y la Indiana V717F y a la edad de 30 días reportó un aumento en la potencia de la actividad theta del hipocampo, lo que señala una alteración temprana de los circuitos neuronales en este modelo. Estos datos apoyan la idea de que las alteraciones a nivel de circuitos cerebrales reflejados en modificaciones del ritmo theta podrían servir como marcadores tempranos de padecimientos como la EA. Adicional a lo anterior Goutagny y su grupo en 2013 encontraron también en el modelo CRND8 a la misma edad una robusta alteración en el acoplamiento de las frecuencias theta y gamma en el hipocampo, que se ha descrito tiene una función sumamente importante en procesos de memoria (Buzsaki et al., 2013). Otro modelo que contiene mutaciones en el gen que codifica para PPA, es el ratón transgénico 5XFAD, el cual contiene las

mutaciones suecas (K670N, M671L), la mutación de Florida (I716V), la mutación Londinense (V717I) en el gen de APP y las mutaciones en PS1 (M146L, L286V). En este modelo se encontró una reducción en la frecuencia de theta a comparación del grupo control. La edad de estos ratones era de alrededor de 70 semanas (Siwek et al., 2015).

Adicionalmente, el grupo de Pérez-Cruz en 2011 encontró deterioro cognitivo a las 32 semanas de edad en un ratón PPA/Lo que correlaciona con una alteración de la conectividad sináptica.

En relación a mutaciones en el gen que codifica para la proteína Tau, un sujeto de estudio ha sido el modelo Tg4510, el cual sobreexpresa la proteína Tau humana con una mutación P301L, la cual genera hiperfosforilación de esta proteína, formación de MNFs y neurodegeneración dependiente de la edad (Booth et al., 2016). En este estudio se demuestra una alteración en la actividad hipocampal: se presenta una oscilación aberrante en el área CA1, la cual se relaciona con alteraciones a nivel cognitivo, esto en ratones de 32 semanas de edad. Este mismo modelo pero a las 28 semanas de edad ha sido caracterizado por el grupo de Scott en el 2016, en donde se realizó un registro de la actividad theta hipocampal estimulando el núcleo pontino oralis del tallo cerebral y encontraron una disminución en la potencia del ritmo theta en el hipocampo, lo que fue atribuido a una disminución en el número de neuronas piramidales en el modelo.

En resumen, los estudios realizados en modelos transgénicos con mutaciones en el gen de la proteína Tau y el gen de la PPA sugieren su contribución a la modificación en la respuesta de los distintos circuitos neuronales, sin embargo, el mecanismo de acción permanece sin ser completamente elucidado.

2.5 MUTACIONES EN PS1 Y SU POTENCIAL PAPEL EN LA AFECTACIÓN DE CIRCUITOS NEURONALES

Se ha considerado que una de las estructuras responsables en la alteración a nivel de circuitos neuronales son las placas de β A en donde la PS1 juega un papel relevante, sin embargo, utilizando un modelo transgénico que se caracteriza por la presencia de mutaciones en el gen de PS1 (L286V), se encontraron signos de neurodegeneración sin la presencia de placas de β A, lo que sugiere la existencia de un mecanismo alterno

por el cual PS1 causa daño de forma independiente a la generación de placas de β A (Chui et al., 1999). En este sentido se ha propuesto que la mutación en PS1 puede causar daño neuronal mediante la acción de ésta sobre las proteínas Notch, las cuales están implicadas en la regulación del ciclo celular, proliferación, diferenciación, apoptosis y neurodegeneración (Nizzari et al., 2012).

Adicionalmente, se encontró un déficit en la memoria espacial y un incremento en los niveles de fosforilación de la proteína Tau en los epítopes S199/202, T231 y S396 en un ratón transgénico *knock in* de la mutación PS1 (V97L)(Wang et al., 2012). Se propuso que la fosforilación de la proteína Tau es producto de una desregulación de la cinasa GSK3 β a través del siguiente mecanismo: GSK3 β es fisiológicamente regulada por la acción de la cinasa Akt, la cual a su vez es activada por el complejo PI3K-N-cadherina (Baki et al., 2004). Se encontró también que la PS1 promueve la asociación del complejo PI3K con la N-cadherina, y que una mutación en esta proteína puede provocar una afectación de este mecanismo, lo que termina por modificar de forma indirecta la fosforilación de la proteína Tau.

Es importante mencionar que se ha reportado la presencia de proteína Tau en sitios postsinápticos, en donde interactúa en condiciones fisiológicas con el complejo receptor NMDA-PSD95 (Mondragón-Rodríguez et al., 2012). Se encontró que al ser fosforilada en ciertos sitios, la proteína Tau disminuye su afinidad con PSD95 (proteína de anclaje), e incrementa a su vez su afinidad por Fyn (tirosín-cinasa), el mecanismo anterior apunta a un papel de la proteína Tau fosforilada en la regulación de las sinapsis en los circuitos hipocampales (Mondragón-Rodríguez et al., 2012). En este sentido, alteraciones en los niveles de fosforilación en la proteína Tau, mediados por mutaciones en el gen de PS1, podrían contribuir a elucidar el mecanismo que causa las respuestas aberrantes en los circuitos cerebrales durante el desarrollo de la EA.

3. JUSTIFICACIÓN

Con base en lo anterior es claro que nuestros datos y los datos publicados sugieren alteraciones a nivel de circuitos cerebrales en modelos transgénicos que presentan mutaciones en el gen que codifica para PS1, sin embargo, no existen datos experimentales que evalúen cómo la mutación en este gen contribuye a la modificación o alteración del funcionamiento de los distintos circuitos cerebrales, particularmente los circuitos del hipocampo. Estos datos serán de vital importancia para comprender el mecanismo de patogénesis en el desarrollo de padecimientos de tipo neurodegenerativo como la patología de Alzheimer. Por lo tanto, en este proyecto se propone el estudio en el modelo 3xTgAD de la contribución de la mutación M146V de PS1 y su papel potencial en la fisiopatología de la EA.

4. HIPÓTESIS

La mutación M146V en el gen de PS1 modifica la actividad de los diversos circuitos neuronales que controlan y regulan la actividad hipocampal, esto durante etapas tempranas del desarrollo de los procesos neurodegenerativos.

5. OBJETIVOS

5.1. GENERAL

Estudiar en el modelo 3xTgAD el efecto de la mutación en PS1 para la generación y modulación del ritmo cerebral theta en una preparación *in-vitro* que preserve los circuitos septo-hipocampales intactos.

5.2. PARTICULARES

- 1.** Evaluar las alteraciones cognitivas en etapas tempranas del neurodesarrollo en el modelo 3xTgAD.
- 2.** Estandarizar la preparación septo-hipocampal para el registro de actividad neuronal theta.
- 3.** Evaluar las alteraciones a nivel de actividad oscilatoria theta.
- 4.** Evaluar el efecto de la mutación PS1 en los niveles de fosforilación en la proteína Tau.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. SUJETOS

Todos los procedimientos fueron realizados bajo las normas del Comité de Bioética de la UNAM para el uso de animales experimentales. El uso de los animales se realizó conforme a las normas internacionales para el cuidado y uso de animales de laboratorio establecidas por el National Research Council of the National Academies (2011) y la NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Asimismo, el protocolo fue aprobado por el Comité de Bioética del Instituto de Neurobiología (INB) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). En este estudio se utilizaron ratones machos y hembras 3xTgAD homocigotos de 30 días de edad generados a partir de un fondo híbrido B6129S. De igual forma, se usaron ratones no transgénicos (NT) de la misma edad mantenidos en el mismo fondo B6129S híbrido. Todos los animales fueron reproducidos y criados en el bioterio del INB UNAM, en cajas de policarbonato (12 x 12 x 25 cm) y en condiciones óptimas de alimentación (dieta para ratón del laboratorio Purina Chow fórmula 5001 y agua *ad libitum*) y de ambientación constante (temperatura entre 20°-25°C; humedad 40-70%) en un ciclo de luz/oscuridad de 12 h, iniciando la luz a las 8:00 h.

6.2. PRUEBA CONDUCTUAL: ANIDACIÓN (NESTING)

Con el propósito de evaluar funciones ejecutivas, se realizó la prueba de anidación (Nesting) en ambos grupos. Esta conducta se presenta tanto en machos como en hembras y su propósito es mantener la termorregulación, se ha reportado que el desempeño de los ratones es inferior cuando se realiza una lesión en el hipocampo (Deacon et al., 2012). Ratones No Transgénicos (NT, empleados como control) y 3xTgAD fueron colocados en cajas individuales con camas de 0.5 cm de profundidad. Ambos grupos se mantuvieron con alimento y agua *ad libitum*. Los ratones fueron manipulados previamente por el experimentador en sesiones de 2-3 minutos por ratón durante 3 días. El día de la prueba se colocó un cuadrado de 5 x 5 cm de algodón una hora antes del inicio del ciclo de oscuridad en la esquina posterior izquierda de la caja habitación. Los ratones realizaron la actividad durante su ciclo activo que es el ciclo de

oscuridad, al iniciar al ciclo de luz se tomaron fotografías de los nidos y se procedió a evaluarlos según la escala reportada por Deacon en el 2012 que va de 1 a 5 según la calidad del nido realizado. El análisis estadístico de los datos obtenidos en esta prueba fue realizado mediante una prueba U de Mann Whitney y se estableció un nivel de significancia del 95%.

6.3. PRUEBA CONDUCTUAL: LABERINTO EN T

Mediante la prueba laberinto en T se evalúa la memoria de trabajo. En los roedores existe una tendencia natural a alternar el brazo elegido del laberinto y la alternación refleja la motivación del animal de explorar su ambiente y localizar comida, agua, parejas o refugio. Sin embargo, los roedores no necesitan estar deprivados para realizar esta conducta, a esto se le llama “alternación espontánea”. Se ha reportado que la alternación es una excelente herramienta para evaluar disfunciones hipocampales, probablemente mejor que el laberinto acuático de Morris ó Water Maze, según sugiere Deacon en 2006. Es por lo anterior que se evaluó el desempeño de los grupos NT y 3xTgAD en esta prueba conductual. El laberinto en T consta de tres brazos como se ilustra en la Figura 10A: un brazo central y dos brazos colocados a 90° de éste (Figura 10A: brazo A y brazo B). La prueba consta de dos fases, en la primera fase se colocó una división hecha de acrílico en la parte cercana a los brazos A y B que divide al brazo central en dos. El ratón fue colocado en el brazo central (como se ilustra en la Figura 10A) para que se desplazara hacia alguno de los brazos (A o B) y entrara completamente en él (incluyendo la punta de la cola), una vez el ratón dentro del brazo se deslizó una puerta de acrílico para impedir que el ratón saliera del brazo por 30 segundos. Al finalizar este periodo se retiraron las puertas de acrílico y comenzó la segunda fase de la prueba. En esta fase se colocó al ratón nuevamente en el brazo central e ingresó a alguno de los brazos del laberinto. Se registró el brazo al que entró el ratón en la primera y segunda fase para calcular el porcentaje de alternancia. Se limpió la cama y se roció una solución de etanol al 70% entre cada prueba. En caso de que el ratón no entrara a ninguno de los brazos, permaneciendo en el brazo central en un periodo de 90 segundos, fue removido del laberinto y se comenzó nuevamente con la prueba después de evaluar otro ratón. El análisis estadístico de los datos obtenidos

en esta prueba fue realizado mediante una prueba U de Mann Whitney y se estableció un nivel de significancia del 95%.

6.4. DISECCIÓN (PREPARACIÓN SEPTO-HIPOCAMPAL)

Ratones NT y 3xTgAD fueron decapitados a la edad de 30 días (p30) sin previa anestesia para preservar la actividad cerebral. Se realizaron cortes en el cráneo del ratón para permitir la remoción rápida del cerebro y posteriormente se colocó en solución de sacarosa a punto de congelación (sacarosa 238 mM, KCl 3 mM, NaHCO₃ 25 mM, MgCl₂ 2.5 mM y glucosa 30 mM, pH=7.4) con un flujo de carbógeno (95% O₂, 5% CO₂). Se permitió que el tejido se atemperara por un periodo de 1-2 minutos. Se realizó la disección en el tejido para extraer hipocampo, septum y sus conexiones intactas. La extracción total de las estructuras se llevó a cabo en un tiempo inferior a 60 segundos y posterior a esto el tejido se colocó en la solución de sacarosa nuevamente, se removió del hielo para incrementar ligeramente la temperatura de la preparación y así disponerla para el registro electrofisiológico.

6.5. REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS

La preparación se transfirió a una cámara de registro en donde se sostuvo con la ayuda de sujetadores. Se colocó líquido ceforraquídeo artificial (LCRa) (NaCl 126 mM, KCl 3mM, NaHCO₃ 25 mM, MgCl₂ 1 mM, CaCl₂ 2 mM y glucosa 11 mM, pH 7.4) y se estableció un flujo de 25 mL/min en la cámara de registro, con una temperatura fija de 37°C. Se permitió que el tejido se estabilizara por un periodo de 25- 30 min. Después de este tiempo, y con la ayuda de un micromanipulador se colocó una micropipeta de vidrio con resistencia de alrededor de 0.5 MΩ sobre el área hipocampal de CA1 en su porción medial. Se registraron los potenciales locales en esta porción del tejido. Dicha actividad fue registrada mediante el uso de amplificadores AC (A-M System), con distintos filtros (0.1 -500 Hz) y una frecuencia de muestreo de 5KHz.

Los datos electrofisiológicos fueron digitalizados, analizados y graficados utilizando pClamp®, MATLAB®, y Origin® (versión 7.5, Origin Lab). Los espectrogramas se diseñaron usando la caja de herramientas de Chronux® (Chronux tool box). La máxima amplitud y frecuencia dominante de las oscilaciones en las diferentes regiones hipocampales se midió a través de la detección del pico máximo

promedio detectado en el espectrograma. Los registros contienen en promedio 5 minutos por sesión. Los datos obtenidos de frecuencia y potencia en los registros de ambos grupos fueron analizados mediante una prueba *t*-student para comparar las medias de ambos grupos y se estableció un nivel de significancia del 95%.

6.6. WESTERN BLOT

Para la cuantificación de las proteínas en la preparación se empleó la técnica de Western Blot. Posterior al registro electrofisiológico, el tejido fue colocado en una solución de Buffer de Lisis (50 mM Trizma Base, 150 mM NaCl, 1 % Triton, 0.5 % SDS, 25 mM NaF, 1 mM Na₄P₂O₇, 10 mM Na₃VO₄, 20 mM β-glycerofosfato e inhibidores de proteasas) con la finalidad de extraer las proteínas. El tejido fue homogeneizado y centrifugado a 10 000 rpm durante 5 minutos. Se extrajo el sobrenadante y se mezcló en proporción 1:1 con Buffer de Loemlii con 4% de β- Mercaptoetanol. Las muestras fueron llevadas a un baño con agua hirviendo durante 8 minutos y después fueron centrifugadas a 14 000 rpm durante 3 minutos.

Se prepararon geles separador y concentrador al 10 y 6% de acrilamida respectivamente, de 8 x 10 cm y se colocaron en una cámara con buffer de electroforesis (0.30% de Tris Base, 1.44% de Glicina, 0.1% de Sulfato Dodecil de Sodio). Se cargaron las muestras de ambos grupos en el gel y se aplicaron 25 mA de corriente durante 120 minutos. Una vez que las proteínas se separaron por su distinto peso molecular, fueron transferidas a una membrana de PVDF al aplicarles 200 mA de corriente por 110 minutos.

Las membranas fueron bloqueadas con una solución al 5% de Leche (Svelty® light) en TBS-Tween (1%) durante dos horas en agitación a una temperatura de 4 °C. Se realizaron tres lavados de 5 minutos con TBS-Tween (1%) y las membranas se incubaron con anticuerpos primarios: p-Tau s396 (Santa Cruz Biotechnology®), p-Tau T231 (ThermoFisher Scientific ®), Tau 5 (Invitrogen®), N-cadherina (BD Biosciences®), Akt s473 (Cell signaling®), Akt total (Cell signaling®) durante toda la noche en agitación a 4°C. Posteriormente se realizaron tres lavados de 5 minutos con TBS-Tween (1%) y se incubaron las membranas los anticuerpos secundarios adecuados: Cabra anti ratón (Abcam®), Cabra anti Conejo (Life Biosciences®) durante 120 minutos a 4 °C.

Finalmente se realizaron tres lavados y se procedió a revelar con el sustrato de HRP (GE Healthcare®, UK).

Se realizaron las cuantificaciones mediante el Software Image J®. Se realizó una prueba *t*-student para identificar diferencias significativas entre la expresión de proteínas en ambos grupos, se estableció un nivel de significancia del 95 %.

6.7. INMUNOFLUORESCENCIA Y MICROSCOPIA

Posterior a la realización del estudio conductual los animales de ambos grupos fueron perfundidos con paraformaldehído (PFA) al 4% y se extrajo el cerebro para posteriormente ser fijados en PFA al 4% seguido de incubación en sacarosa 30% hasta punto de saturación. El tejido fue seccionado a 40µm de grosor en criostato (-21°C).

Se realizó una caracterización in situ de los agregados de la proteína tau por inmunofluorescencia, utilizando los siguientes anticuerpos p-Tau s396, p-Tau Thr231, Tau 5. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron dirigidos hacia una especie en particular de animal y específicos para las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas de ratón o conejo (Anti Mo IgG µ específico, Anti Rb IgG), acoplados a diferentes fluoróforos; FITC/alexa 488, Rodamina/Alexa 568 (Invitrogen®, CA y Molecular Probes, USA.). El tejido fue seleccionado y lavado con Buffer de Fosfatos (PBS, por sus siglas en inglés) en tres ocasiones durante 10 minutos. Se aplicó buffer de bloqueo (3% suero de burro + 0.3% triton X-100 en PBS 0.1 M) por una hora. Se incubó el tejido durante toda la noche con los anticuerpos primarios en una solución (1% suero de burro + 0.1% triton X-100 en PBS 0.1 M) La incubación con los anticuerpos primarios se realizó a 4°C. Se realizaron tres lavados de 10 minutos con PBS 0.1 M al tejido previo a su incubación con el anticuerpo secundario correspondiente durante 120 minutos. El tejido fue nuevamente lavado por 10 minutos e incubado con DAPI (tinción nuclear) por 15 minutos. El tejido fue lavado y finalmente montado en laminillas. Las laminillas con el tejido se deshidrataron con un tren de alcohol etílico al 75%, 95%, 100% y a Xileno para finalmente ser montadas con VectaShield® (Vector Laboratories®). Las preparaciones histológicas se observaron en un microscopio de Fluorescencia Axio Imager 2 ZEISS.

6.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó mediante el programa SPSS STATISTICS Software®. Inicialmente se analizó la distribución de los datos mediante la prueba de Kolmogorov y Shapiro Wilk, posteriormente, dependiendo de la distribución normal o no normal de los datos se realizaron las pruebas post-hoc correspondientes. Se estableció un nivel de significancia del 95% en todas las pruebas. (*= $p < 0.05$, **= $p \leq 0.01$, ***= $p \leq 0.001$, #= $p \leq 0.0001$)

7. RESULTADOS

7.1 EL GRUPO 3xTgAD NO PRESENTÓ ALTERACIONES A NIVEL DE FUNCIONES EJECUTIVAS A LOS 30 DÍAS DE EDAD

Se ha reportado una disminución del desempeño en la prueba de Nesting de los ratones 3xTgAD a los 24 meses de edad (Torres-Lista et al., 2013), lo que correlaciona con la presencia de las placas de βA y MNFs (Oddo et al., 2003). También en estos ratones (3xTgAD) se presenta una alteración a nivel de actividad cerebral a los seis meses de edad (Oddo et al., 2003).

Cuando evaluamos posibles alteraciones en las funciones ejecutivas en los ratones 3xTgAD (p30) en la prueba de Nesting, no se observaron diferencias significativas en la calidad de los nidos de ambos grupos (Figura 9C). En la Figura 9A se observa un ratón del grupo NT después de realizar la prueba obteniendo un nido con calificación de 2, según la escala de Deacon (Deacon et al., 2012). En la figura 9B se observa un ratón del grupo 3xTgAD después de realizar la prueba obteniendo un nido con calificación de 2, según la misma escala. La prueba U de Mann Whitney confirma que no existe diferencia en el desempeño del grupo 3xTgAD, el cual tiene una mediana de 2 y un RIC=2 cuando se comparó contra el grupo NT, en el que se obtuvo una mediana de 2 y un RIC=0 con una $p=0.33$ (Figura 9C).

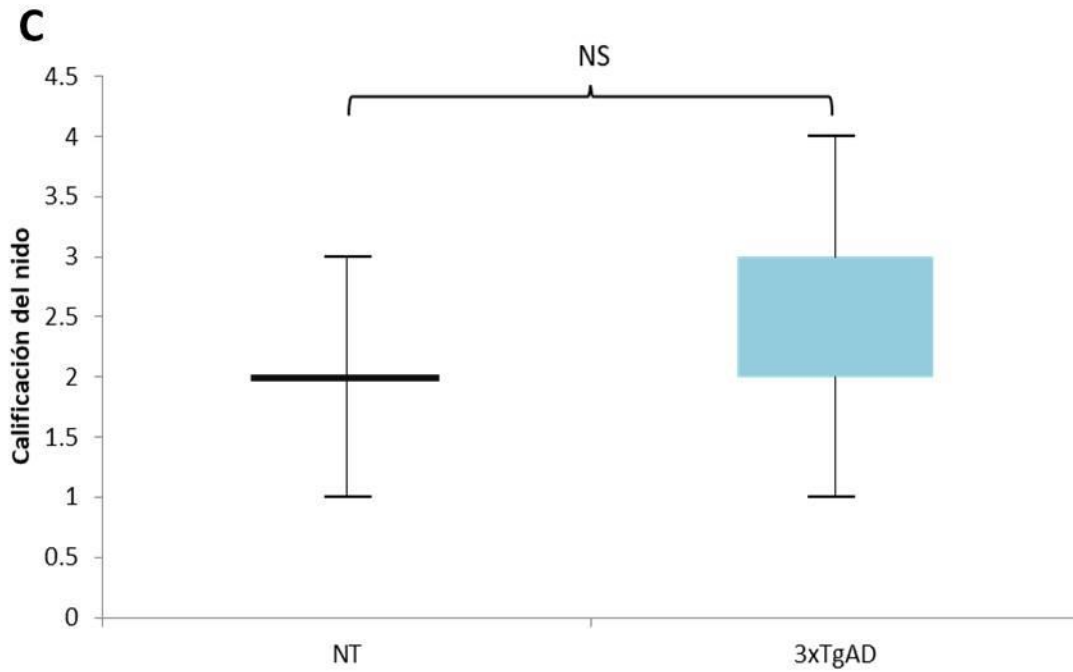
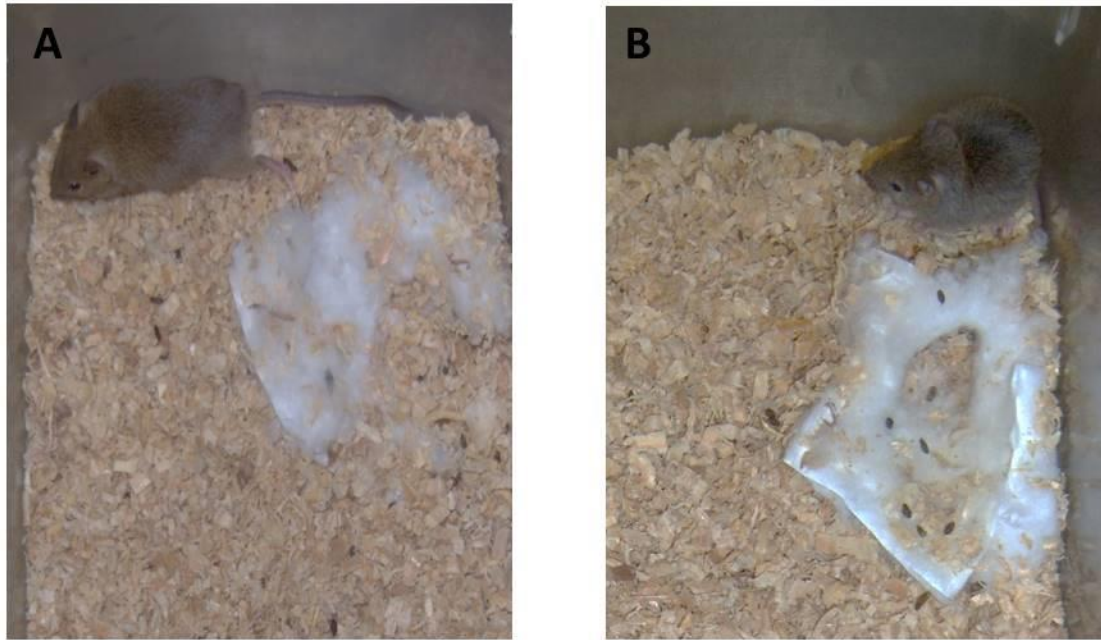


Figura 9. Prueba de Nesting. **A.** Ratón NT después de realizar la prueba. **B.** Ratón 3xTgAD después de realizar la prueba. **C.** Evaluación del desempeño de los grupos. No se observa diferencias entre el grupo NT y el 3xTgAD a los 30 días de edad (NT; n= 11 y 3xTgAD; n=11). Prueba estadística: U de Mann Whitney.

Otra prueba de gran valor para la evaluación de la función hipocampal es el laberinto en T (Deacon, 2006), se evaluó el desempeño de ambos grupos en esta prueba a p30. En la Figura 10A se observa un esquema representativo del laberinto en T empleado en la prueba. El desempeño de ambos grupos se evaluó mediante el porcentaje de alternancia espontánea, la mediana del grupo NT fue de 66.67% con un RIC=41.7 y el grupo 3xTgAD obtuvo una media de 50% con un RIC=16.7 (Figura 10B). El análisis estadístico confirmó que no existen diferencias significativas en el porcentaje de alternancia espontánea en ambos grupos.

En resumen, el ratón 3xTgAD no presentó alteraciones en tareas hipocampo-dependientes a la edad de 30 días.

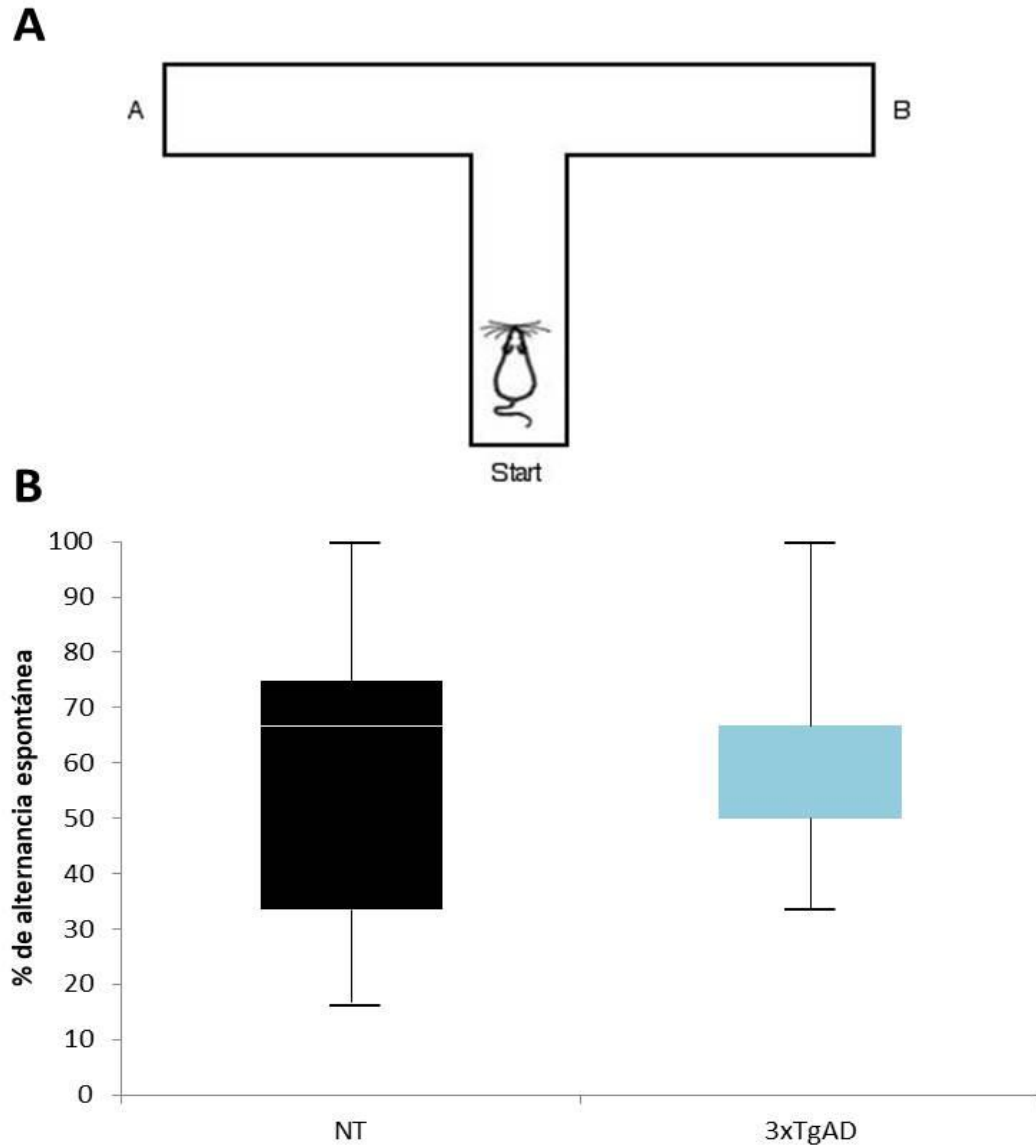


Figura 10. Prueba conductual laberinto en T. **A.** Esquema del laberinto constituido el brazo central y los brazos laterales. **B.** No se observa diferencias entre el grupo NT y el 3xTgAD a los 30 días de edad (NT; n= 9 y 3xTgAD; n=9). Prueba estadística: U de Mann Whitney.

7.2 ESTANDARIZACIÓN DE LA PREPARACIÓN SEPTO-HIPOCAMPAL PARA EL REGISTRO ELECTROFISIOLÓGICO DE ACTIVIDAD THETA

Con la finalidad de evaluar posibles alteraciones a nivel de la actividad theta hipocampal de los ratones 3xTgAD, se realizó la estandarización de la preparación septo-hipocampal como se muestra en la Figura 11. El procedimiento se realizó como lo describe (Manseau et al., 2008). El primer paso consistió en la extracción del cerebro del cráneo del ratón al día postnatal 30 (p30) (Figura 11A). Posterior a esto se procedió a la remoción del cerebelo y el bulbo olfatorio del ratón. Se separaron ambos hemisferios y fueron manipulados de forma individual. Con una espátula se separó el Septum Medial y la Banda Diagonal de Broca (MSDBB) del tálamo (TH) (Figura 11B). Se realizó un corte con la espátula para separar una porción de corteza cerebral del extremo septal del hipocampo dorsal (Figura 11C). Se removió el tallo cerebral para exponer el hipocampo (Figura 11D y 11E). Se colocó la espátula por debajo del Septum medial y Banda Diagonal de Broca (MSDBB) y se separó cuidadosamente esta estructura, el hipocampo y la unión entre ellas (fimbria) de la porción de corteza remanente (Figura 11F). Finalmente, el resultado fue la obtención de una preparación que preserva los circuitos septo-hipocampales intactos en donde realizamos nuestros registros de actividad eléctrica (Figura 11G y 11H).

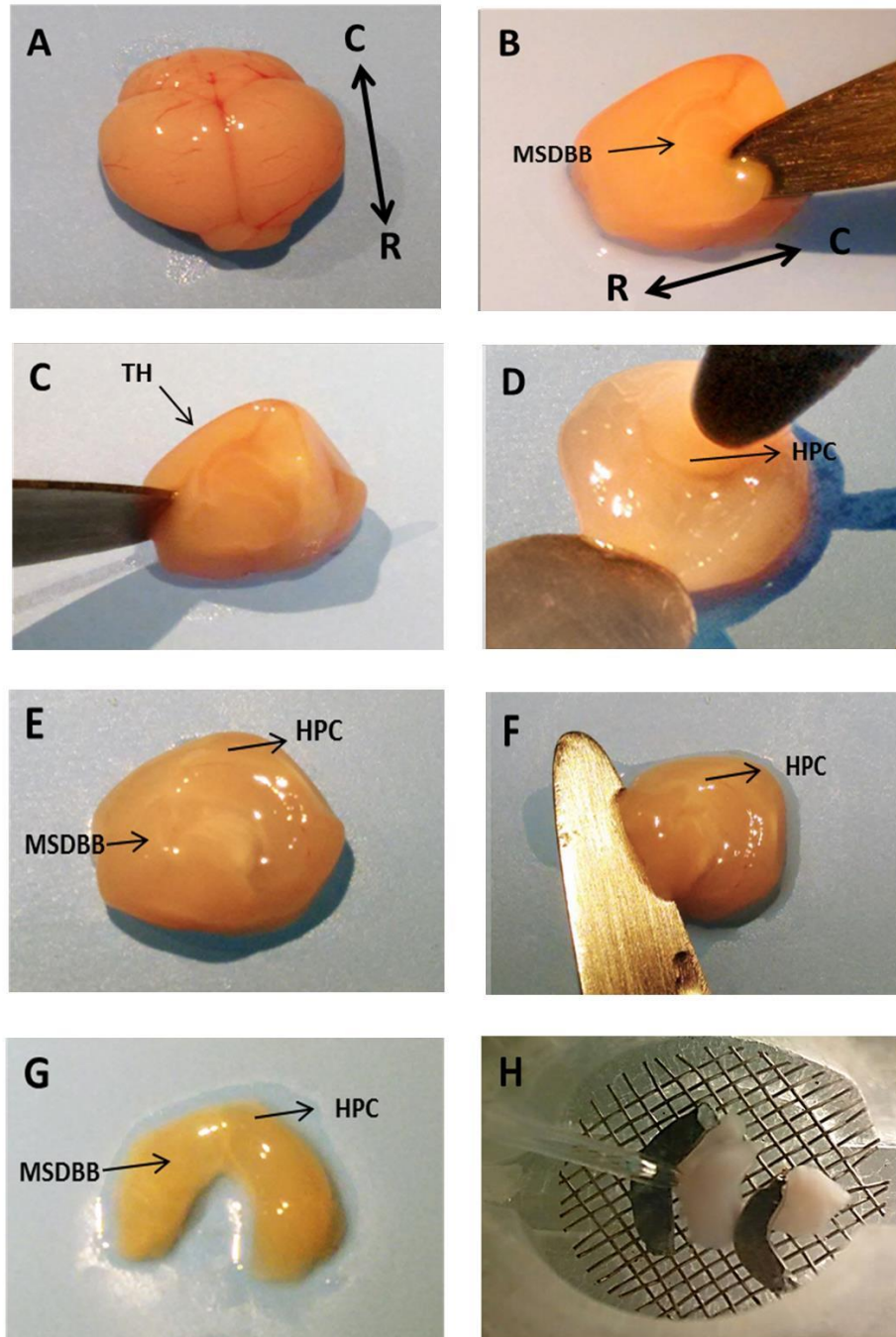


Figura 11. Secuencia de pasos para obtener la preparación septo-hipocampal completa (A-G) Posición de registro en la región CA1 del hipocampo (H). HPC= Hipocampo; MSDBB= Septum medial y Banda Diagonal de Broca; TH=Tálamo; C=caudal; R=Rostral.

7.3 LA POTENCIA TOTAL EN LA BANDA DE THETA SE ENCONTRÓ AFECTADA EN EL MODELO 3xTgAD

La actividad oscilatoria en la frecuencia de theta puede ser evaluada realizando registros extracelulares en la preparación septo-hipocampal (Goutagny et al., 2013). En este sentido, se estudiaron las características principales y alteraciones potenciales de las oscilaciones hipocampales endógenas en el área CA1 media de ratones 3xTgAD y se comparó con el grupo NT. Los registros se realizaron a p30 en ambos grupos (ver Material y Métodos). Nuestros registros evidenciaron actividad rítmica en los ratones NT y en los ratones 3xTgAD (Figura 12A y 12B). Los trazos filtrados confirman la presencia de actividad theta en la región CA1 del hipocampo en ratones NT y 3xTgAD (Figura 12A y 12B). De manera importante, la ritmicidad (periodicidad) de la actividad oscilatoria en los ratones 3xTgAD se ve alterada cuando se compara directamente con el ratón NT (Figura 12B). Dichas alteraciones se aprecian en las ampliaciones de los trazos (Figura 12A y 12B, recuadros inferiores). Para evaluar cambios a nivel de frecuencia de la actividad theta en nuestro modelo 3xTgAD en función el tiempo se realizaron los espectrogramas de potencia (Figura 12D), los cuales evidenciaron un incremento a nivel de potencia en la actividad theta del modelo 3xTgAD (Figura 12D) cuando se comparó con el grupo NT (Figura 12C). El incremento de potencia se corroboró al graficar la potencia del pico máximo de theta en función del tiempo en el grupo 3xTgAD (Figura 12F) Mientras que el grupo NT mostró un pico máximo de frecuencia menor (Figura 12E). La frecuencia del pico máximo de theta se representa en las Figuras 12G y 12H, en las que se observa una similitud entre ambos grupos. El análisis estadístico confirmó un incremento significativo de casi el doble en el grupo 3xTgAD comparado con el grupo NT, $p=0.02$ (Figura 12J). Por otra parte, el análisis estadístico confirmó que no existe diferencia significativa a nivel de frecuencia entre ambos grupos (Figura 12I y 12J).

En resumen, se observaron alteraciones a nivel de potencia en la actividad theta en ratones jóvenes 3xTgAD en comparación con el grupo NT.

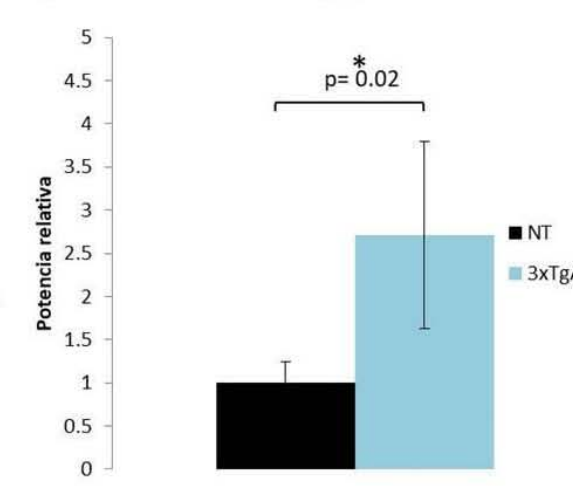
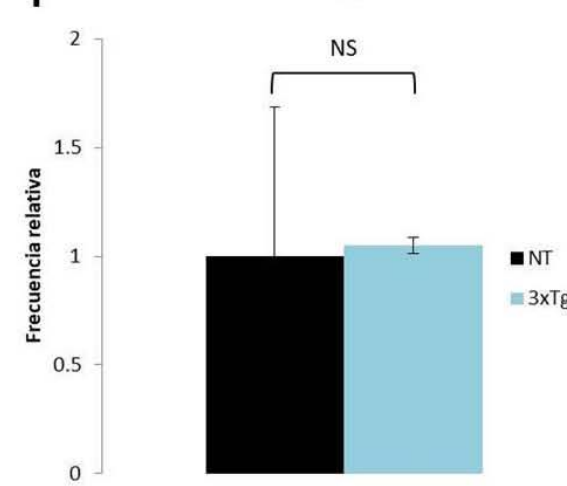
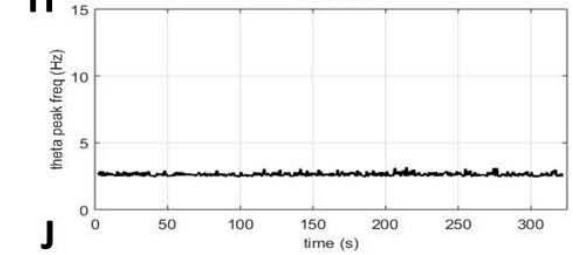
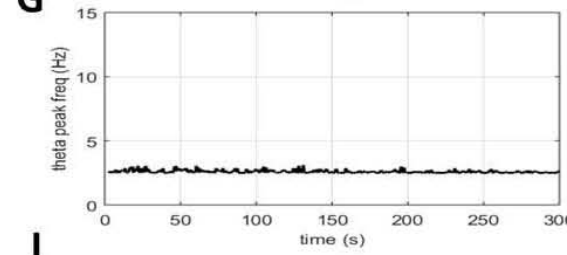
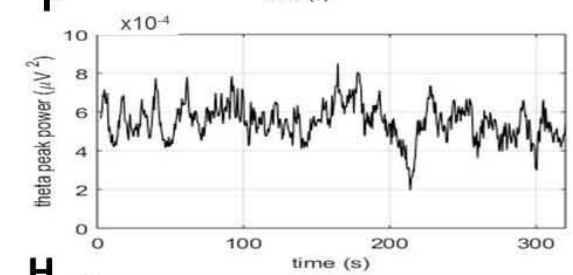
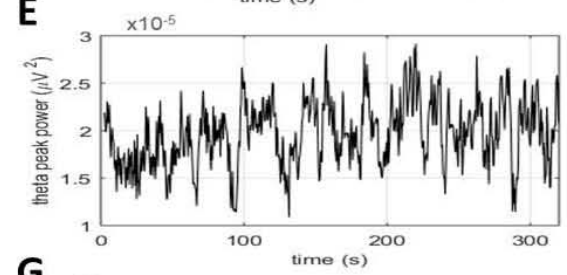
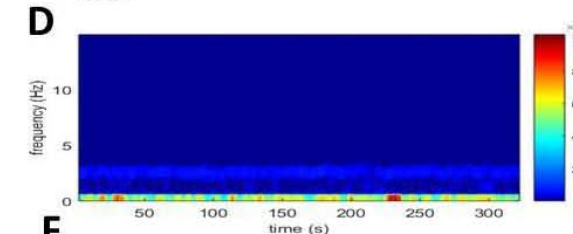
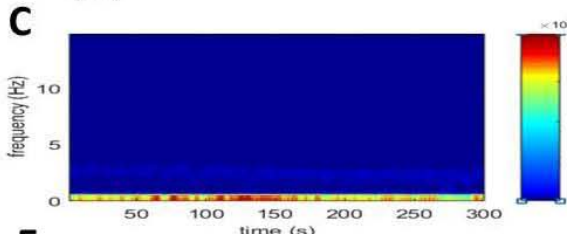
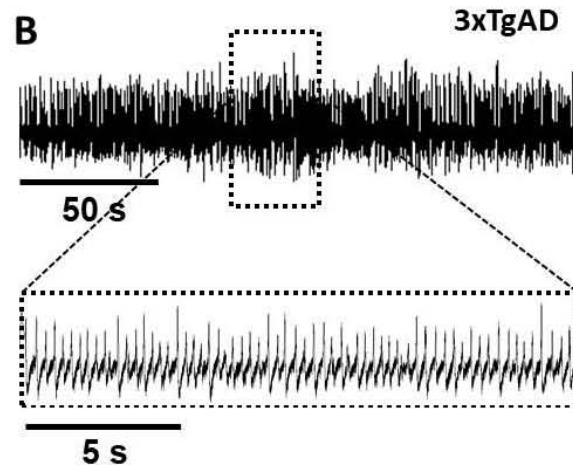
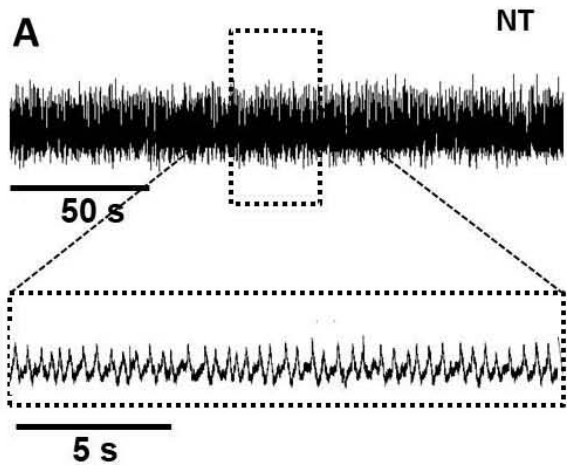


Figura 12. Registro electrofisiológico de campo. Área CA1 hipocampal, capa piramidal. Ratones NT y 3xTgAD, p30. **A.** Trazo representativo de registro en un ratón NT y **B.** de un ratón 3xTgAD. **C.** Espectrogramas de potencia en ratón NT y **D.** ratón 3xTgAD. **E.** Representación del pico de potencia en la frecuencia de theta en un ratón NT y **F.** de un ratón 3xTgAD. **G.** Representación de la frecuencia del pico de theta en ratón NT y **H.** en ratón 3xTgAD. **I.** Comparación de la frecuencia del ritmo theta en el grupo NT y 3xTgAD, no se observan diferencias entre ambos. **J.** Comparación de la potencia de la actividad theta en el grupo NT y 3xTgAD, se observa un aumento significativo en la potencia del grupo 3xTgAD en comparación con el grupo NT. $P= 0.02$. (NT; $n= 6$ y 3xTgAD; $n=6$). Prueba estadística: *t*-student * $p<0.05$.

7.4 EL GRUPO 3xTgAD PRESENTA NIVELES INCREMENTADOS DE FOSFORILACIÓN EN EL RESIDUO S396 DE LA PROTEÍNA TAU

El residuo de la proteína Tau S396 forma parte del sitio de fosforilación conocido como PHF-1, este sitio ha sido reconocido como uno de los primeros sitios en ser fosforilado en etapas tempranas de la EA y del Síndrome de Down (Mondragón-Rodríguez et al., 2014). Es por la importancia de este sitio de fosforilación que investigamos mediante la técnica de Western Blot los niveles de fosforilación de esta proteína en nuestro modelo. El tejido de la preparación septo hipocampal de ambos grupos a p30 fue procesado para extraer las proteínas. Como se observa en la Figura 13 en el panel A, los niveles de fosforilación de la proteína Tau en el residuo S396 (sitio reconocido por el anticuerpo PHF-1) se ven incrementados en el grupo del ratón 3xTgAD (2.21 ± 0.29) en comparación al grupo NT (Datos normalizados). En el panel B se observa la cuantificación de lo anterior, encontrándose que los niveles de fosforilación de la proteína en este residuo se encuentran elevados en una proporción mayor al doble en el grupo 3xTgAD en comparación con el grupo NT, el análisis estadístico de los resultados arrojó una diferencia significativa entre ambos grupos ($p<0.0001$; NT; $n= 6$ y 3xTgAD; $n=6$).

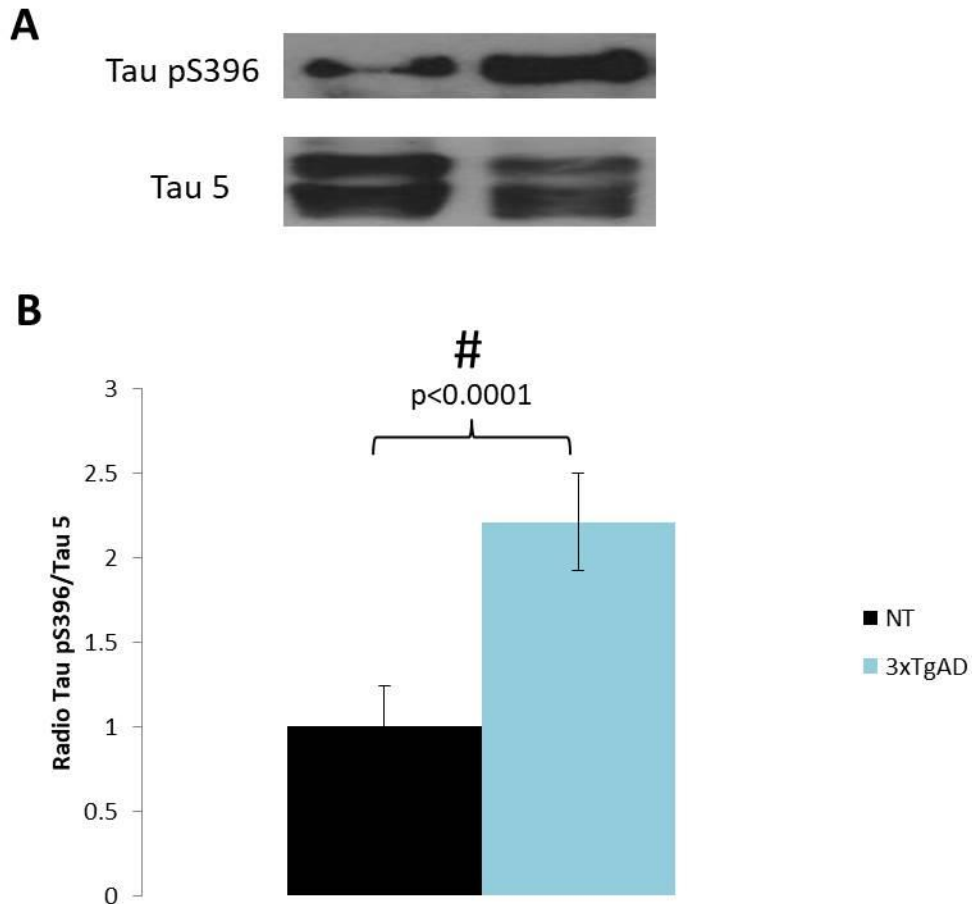


Figura 13. Evaluación de los niveles de fosforilación de la proteína Tau en el residuo S396 a p30. **A.** Figura representativa de los niveles de fosforilación encontrados en el grupo NT (Izquierda arriba), y de los niveles en el grupo 3xTgAD (Derecha arriba) contrastados con los niveles totales de la proteína Tau marcados con el anticuerpo Tau 5. **B.** Cuantificación de la razón Tau pS396/Tau 5 en ambos grupos. El grupo 3xTgAD mostró un incremento de más del doble en comparación al grupo NT ($p < 0.0001$; NT; $n = 6$ y 3xTgAD; $n = 6$). Prueba estadística *t*-student, # $p < 0.0001$.

7.5 LA PROTEÍNA TAU FOSFORILADA EN EL SITIO S396 SE LOCALIZA EN LA CAPA PIRAMIDAL DEL HIPOCAMPO

Una vez demostrado que los niveles de fosforilación en la proteína Tau en el sitio S396 se encuentran incrementados en el grupo 3xTgAD (Figura 13) y dada la importancia previamente comentada de este sitio de fosforilación en la EA, se realizó la técnica de inmunohistoquímica, con la finalidad de localizar el sitio anatómico en el que se localiza la proteína Tau fosforilada en el sitio S396 dentro del hipocampo del ratón 3xTgAD.

Nuestros datos evidenciaron un incremento en los niveles de expresión de la proteína Tau fosforilada en el hipocampo del ratón 3xTgAD en la capa piramidal de CA1 (Figura 14A). De manera importante cabe mencionar que la marca del anticuerpo no está confinada a una región neuronal, sino que está presente tanto en el soma de la neurona como en los procesos dendríticos de la misma (Figura 14B).

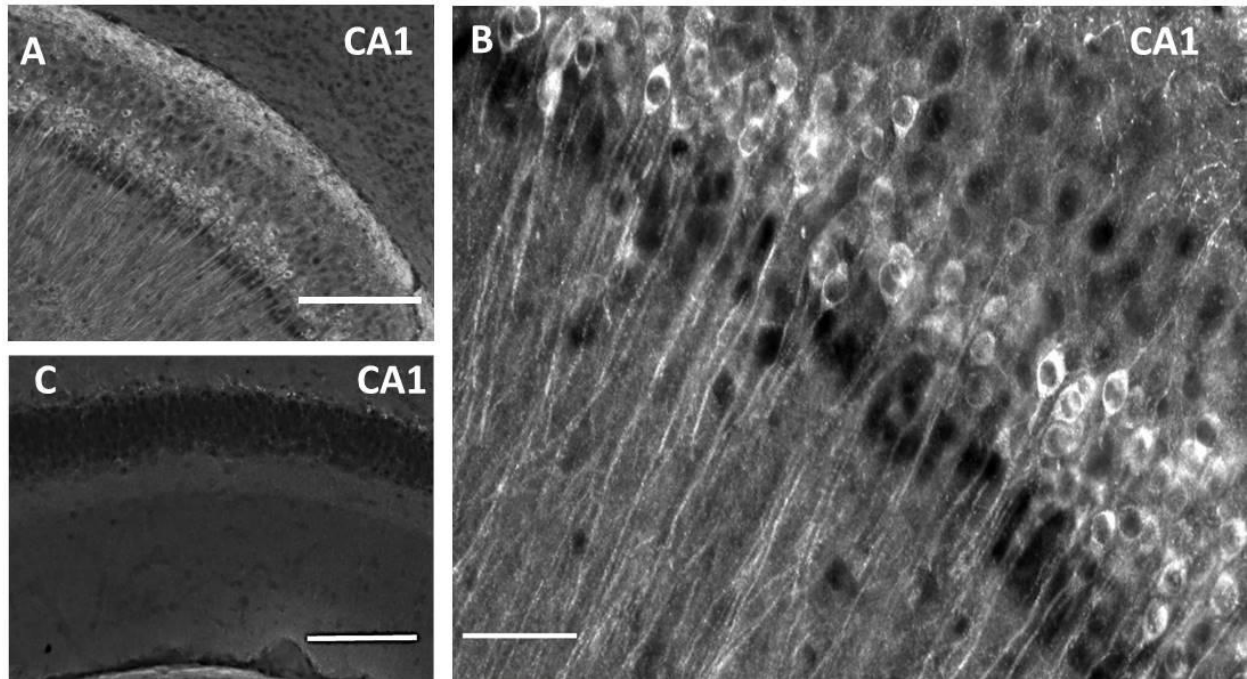


Figura 14. Localización de proteína Tau fosforilada en el sitio S396. **A)** Se observa claramente la marca del anticuerpo anti Tau S396 en el área de CA1 del hipocampo del ratón 3xTgAD (barra 100 μ m). **B)** El marcaje se observa en el soma y los procesos dendríticos de las neuronas piramidales en el ratón 3xTgAD (barra 50 μ m). **C)** En el ratón NT no se observa el marcaje del anticuerpo Tau S396 en la capa piramidal del hipocampo (10x, barra 100 μ m; NT; n= 5 y 3xTgAD; n=5).

7.6 LA PROTEÍNA TAU SE ENCUENTRA HIPERFOSFORILADA EN MÁS DE UN SITIO Y SE LOCALIZA EN LA CAPA PIRAMIDAL DEL HIPOCAMPO

Además del sitio de fosforilación S396 de la proteína Tau se ha descrito también la importancia de otro sitio de fosforilación de esta proteína en la EA, este sitio es el T231 (Mondragón-Rodríguez et al., 2012). Teniendo lo anterior en cuenta y dado el hallazgo de la fosforilación en el sitio S396 de la proteína Tau, decidimos evaluar los niveles de fosforilación de la proteína Tau en el sitio T231, encontrando un incremento significativo

de más del triple en los niveles de fosforilación en este sitio en el grupo 3xTgAD (3.91 ± 0.99) comparado con el grupo NT (Figura 15). El análisis estadístico empleado fue una *t* Student $p=0.0002$.

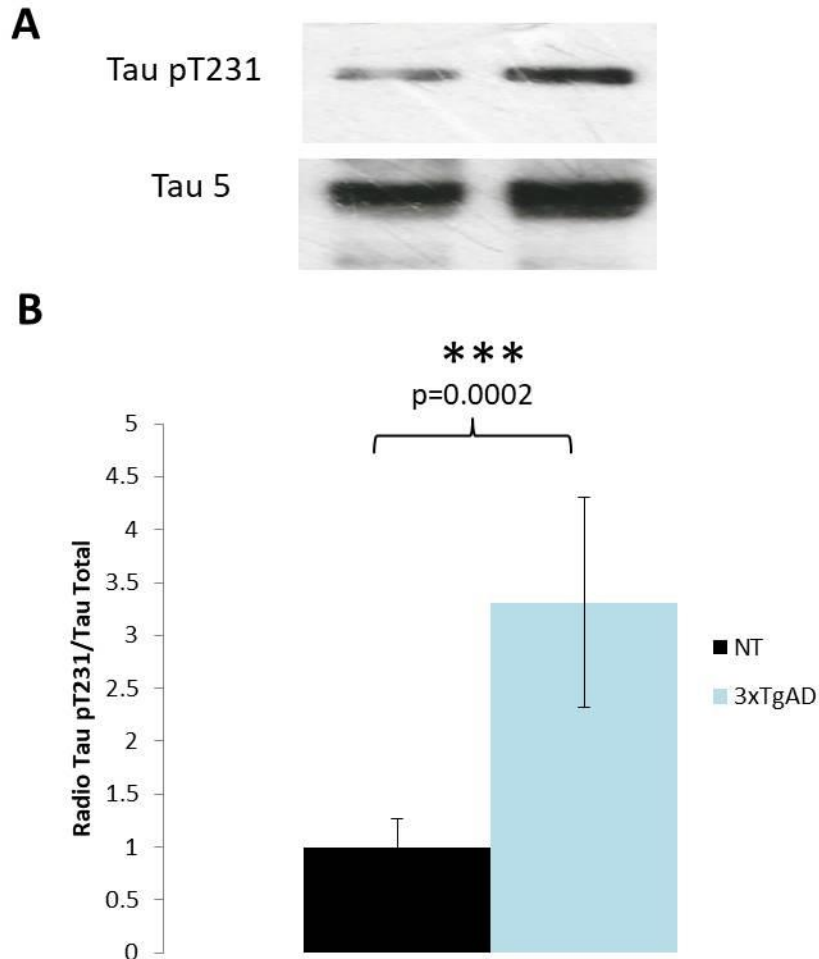


Figura 15. Evaluación de los niveles de fosforilación de la proteína Tau en el sitio T231 a p30. **A.** Figura representativa de los niveles de fosforilación encontrados en el grupo NT (Izquierda arriba), y de los niveles en el grupo 3xTgAD (Derecha arriba) contrastados con los niveles totales de la proteína Tau marcados con el anticuerpo Tau 5. **B.** Cuantificación de la razón Tau pT231/Tau 5 en ambos grupos. El grupo 3xTgAD mostró un incremento de más del triple en comparación al grupo NT ($p=0.0002$; NT; $n=6$ y 3xTgAD; $n=6$). Prueba estadística: *t*-student, *** $p<0.001$.

Semejante a S396, el sitio T231 se localizó en el área hipocampal CA1 del ratón 3xTgAD (Figura 16A). De igual manera que S396 la fosforilación de la proteína en T231 no está limitada al soma de la neurona, sino que también se extiende a los procesos

dendríticos (Figura 16B). En el ratón NT, no se observa incremento en la fosforilación del sitio T231 de la proteína Tau (Figura 16C). Adicional a lo interior, se realizó una cuantificación de los niveles de fosforilación del sitio T231 en el grupo 3xTgAD y el grupo NT.

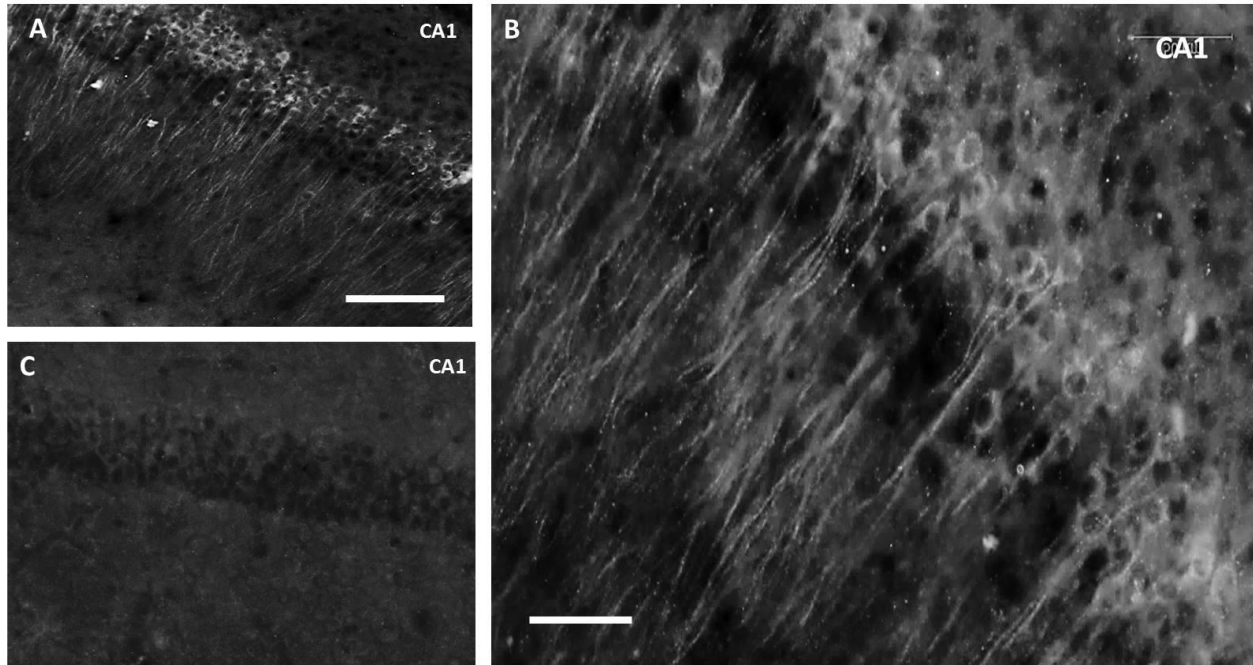


Figura 16. Localización de proteína Tau fosforilada en el sitio T231. **A)** En el área de CA1 del hipocampo del ratón 3xTgAD se localiza la marca del anticuerpo anti Tau T231 (barra 100µm). **B)** En el ratón 3xTgAD la marca del anticuerpo se puede apreciar en soma y en neuritas de las neuronas piramidales (barra 50µm). **C)** En el ratón NT no se observa el marcaje del anticuerpo Tau T231 en la capa piramidal del hipocampo (barra 100µm; NT; n= 5 y 3xTgAD; n=5).

7.7 COMPARACIÓN DE LOS NIVELES DE FLUORESCENCIA EN LOS SITIOS DE FOSFORILACIÓN DE LA PROTEÍNA TAU: S396 Y T231

Dado que los niveles de fosforilación de la proteína Tau se encontró incrementados en los sitios S396 (Figura 14) y T231 (Figura 16) en la capa piramidal del área CA1 hipocampal en el ratón 3xTgAD, nos interesamos por hacer una comparación de los niveles de la fluorescencia de ambos. Se realizó un estudio neuropatológico con análisis estadístico comparando las tinciones entre sí y contra el grupo NT. El análisis confirmó un incremento significativo de los niveles de fosforilación en el sitio S396 del

ratón 3xTgAD comparado con el ratón NT ($p=0.001$), además se confirmó el aumento significativo en el grupo 3xTgAD contra el grupo NT en los niveles de fosforilación en el sitio T231 ($p=0.001$). De manera interesante se encontró que niveles de fluorescencia en el sitio S396 se encuentran significativamente incrementados cuando se comparan con los niveles de expresión en el sitio T231 (Figura 17, $p=0.001$).

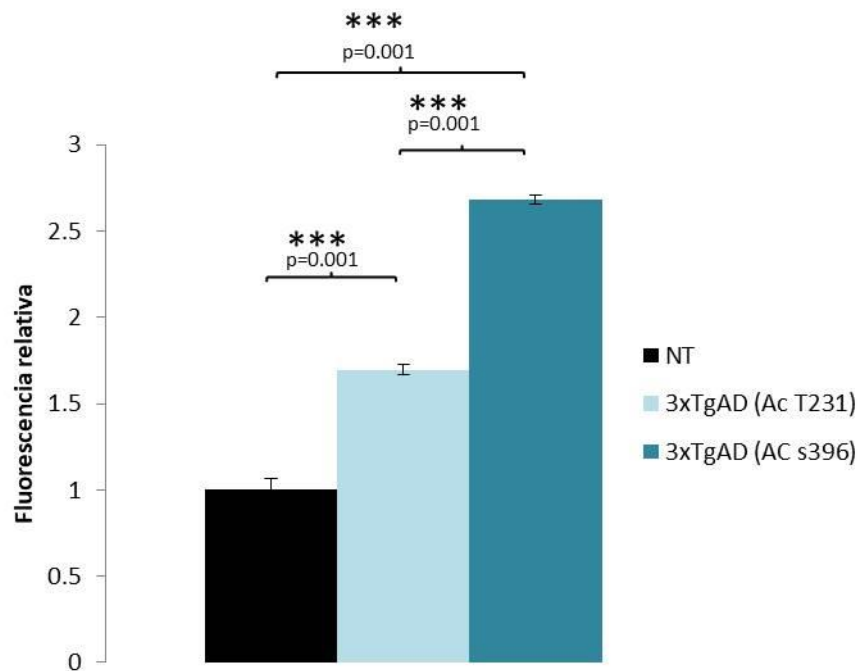


Figura 17. Comparación de dos sitios de fosforilación de la proteína Tau en el ratón 3xTgAD. El análisis estadístico indica una diferencia en los niveles de fluorescencia encontrados con los diferentes anticuerpos. El anticuerpo anti Tau T231 muestra un incremento de más del 50% comparado con el ratón NT ($p=0.001$), mientras que el anticuerpo anti Tau S396 casi triplica los niveles de fluorescencia encontrados en el ratón NT ($p=0.001$, NT; $n= 5$ y 3xTgAD; $n=5$). Prueba estadística: ANOVA de un factor, prueba post hoc Bonferroni *** $p=0.001$.

7.8 EXISTEN NIVELES INCREMENTADOS DEL FCT DE LA N-CADHERINA EN EL RATÓN 3xTgAD

Como previamente mencionamos, la N-cadherina es un sustrato muy importante para el complejo de la γ secretasa y, específicamente para la Presenilina 1 (Huntley et al., 2002; Wang et al., 2006). Adicionalmente, se ha demostrado que puede regular la organización de circuitos sinápticos excitatorios e inhibitorios en el hipocampo (Nikitzuk et al., 2014). Por lo anterior, investigamos los niveles de la N-cadherina de longitud entera (LE) y de su fragmento carboxilo terminal (FCT) en nuestro modelo, el ratón 3xTgAD. Se calculó la razón entre FCT y LE. Se identificó un incremento estadísticamente significativo $p=0.001$ en la razón FCT/LE de los ratones del grupo 3xTgAD (4.81 ± 1.91) (Figura 18) en comparación al grupo NT (datos normalizados) mediante la prueba de *t*-student. La N-cadherina al ser un sustrato muy importante para la Presenilina 1, sugiere que el incremento de su sustrato directo, el FCT, es indicativo de una disminución de la actividad de la Presenilina 1 en el ratón 3xTgAD (Wang et al., 2006). Por otro lado, la pérdida de la función de la PS1 ha sido relacionada con la modulación de la vía PI3K/Akt, disminuyendo los niveles de Akt activa (Baki et al., 2004).

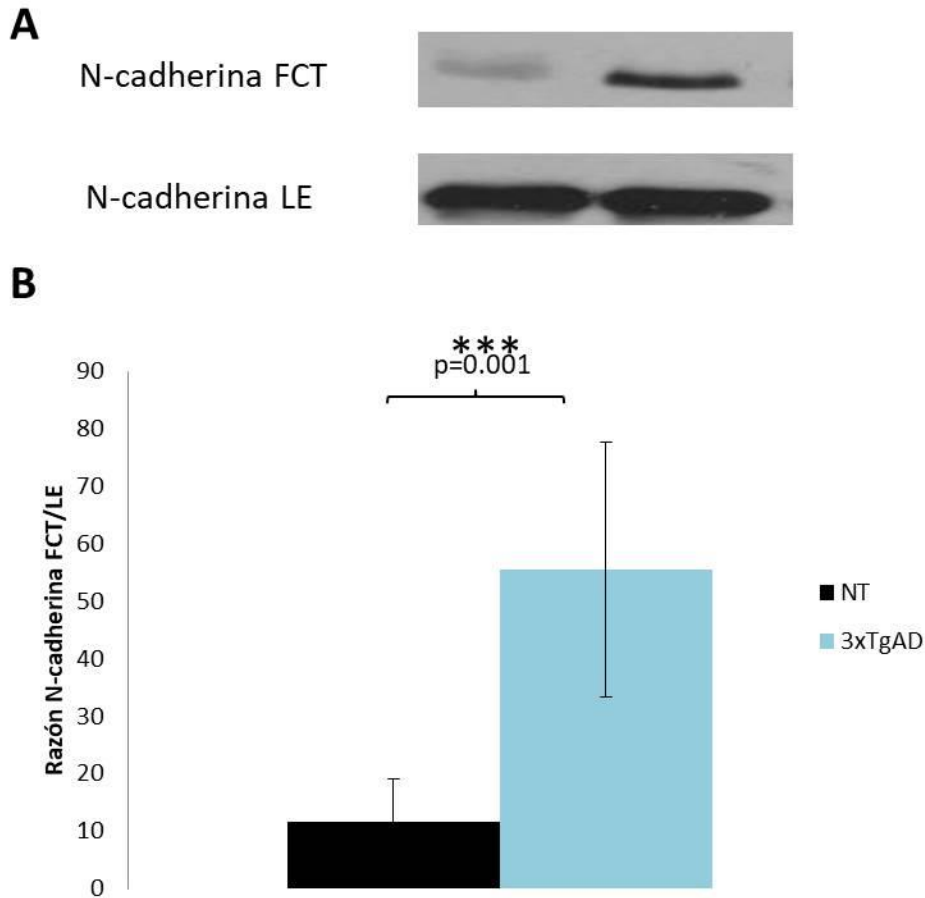


Figura 18. Evaluación de los niveles del Fragmento Carboxilo Terminal (FCT) y la proteína N-cadherina de Longitud Entera (LE) en el ratón 3xTgAD y el ratón NT. **A.** Figura representativa de los niveles de la proteína N-cadherina FCT en un ratón del grupo NT (Izquierda arriba) y un ratón del grupo 3xTgAD (Derecha arriba) y de la N-cadherina LE en un ratón del grupo NT (Izquierda abajo) y un ratón 3xTgAD (Derecha abajo). **B.** Comparación de la razón N-cadherina FCT/LE entre ambos grupos. Los niveles del radio N-cadherina FCT/LE se encuentran incrementados en el grupo 3xTgAD $p=0.001$. (NT; $n=7$ y 3xTgAD; $n=7$). Prueba estadística: *t*-student, $***p=0.001$.

7.9 LA ACTIVIDAD DE LA CINASA AKT ESTÁ DISMINUIDA EN EL GRUPO 3xTgAD

La cinasa Akt pertenece a la vía de PI3K/Akt/GSK-3, cascada arriba en esta vía se encuentra implicada la PS1 (Baki et al., 2004;). Ya que el procesamiento de la N-cadherina está afectado en el grupo 3xTgAD (Figura 18) indicando una pérdida de función de la PS1-M146V se decidió evaluar los niveles de activación de la cinasa Akt (fosforilada en el sitio S473). Mediante la técnica de western Blot se encontró una

disminución de casi el 50% en la actividad de la misma en el grupo 3xTgAD (0.38 ± 0.12) comparado contra el grupo NT (datos normalizados) como se observa en la Figura 19 ($p=0.0001$), la prueba estadística empleada para el análisis fue *t* Student.

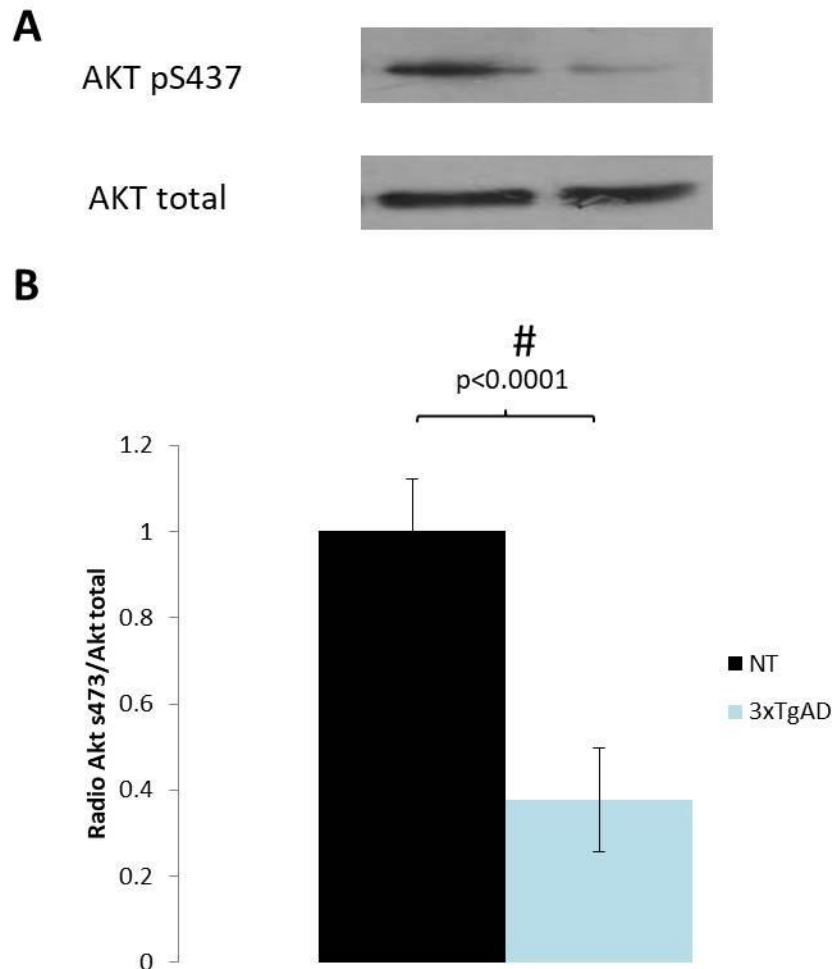


Figura 19. Evaluación del porcentaje de Akt s473 en el ratón 3xTgAD y el ratón NT. **A.** Figura representativa de los niveles de Akt s473 en un ratón del grupo NT (Izquierda arriba) y un ratón del grupo 3xTgAD (Derecha arriba) y de Akt total en un ratón del grupo NT (Izquierda abajo) y un ratón 3xTgAD (Derecha abajo). **B.** Comparación de la razón Akt s473/Akt total entre ambos grupos. Los niveles de Akt s473 se encuentran disminuidos a más de la mitad en el grupo 3xTgAD comparado con el grupo NT. $P < 0.0001$. (NT; $n = 7$ y 3xTgAD; $n = 7$). Prueba estadística: *t*-student, # $p < 0.0001$.

8. DISCUSIÓN

El objetivo general de este proyecto fue identificar la contribución de la mutación M146V en el gen de la PS1 en la alteración de las funciones hipocampales en un modelo de ratón transgénico 3xTgAD que desarrolla los marcadores clásicos de la EA (Oddo et al., 2003). Para evaluar las potenciales alteraciones en el hipocampo se realizó una caracterización a nivel conductual y electrofisiológico.

Nuestros resultados en las pruebas de Nesting evidenciaron que los ratones 3xTgAD a p30 no presentan deficiencias de la función del hipocampo (Figura 9). Apoyando nuestros datos Orta-Salazar y colaboradores, 2013 evaluaron la prueba de Nesting en ratones 3xTgAD de 44 semanas de edad, encontrando una deficiencia del 50% en la calidad del nido realizado. Adicionalmente el grupo de Torres-Lista en 2013 reporta una disminución en la calidad del nido realizado por ratones 3xTgAD de 24 y 44 semanas de edad, evidenciando que las alteraciones conductuales de este modelo en esta prueba inician en este periodo.

Aunado a la prueba de Nesting, no se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de alternancia espontánea en el laberinto en T a p30 en el grupo 3xTgAD (Figura 10). Por otro lado, se ha reportado una disminución en la alternancia espontánea de los ratones 3xTgAD evaluados entre 24 a 34 semanas de edad (Davis et al., 2017), sin embargo, no existen reportes del desempeño del modelo 3xTgAD a p30. En este sentido nuestros hallazgos conductuales correlacionan con lo reportado por Billings y colaboradores en 2005, estudio en el cual se evalúa el desempeño conductual de este modelo a las 8 semanas de edad y no se encuentran alteraciones en tareas dependientes de hipocampo.

Para continuar con la evaluación de la función hipocampal en el modelo 3xTgAD se realizaron registros electrofisiológicos de campo en el área CA1 del mismo. Nuestros resultados evidenciaron un incremento significativo en la potencia de la banda de theta comparado con el grupo NT (Figura 12). Estos datos correlacionan con lo reportado por Goutagny y colaboradores en 2013, en donde a la edad de 30 días se observa una tendencia de incremento en la potencia de la actividad theta hipocampal en el modelo de la EA, el TgCRND8. Por tanto, es claro que nuestros hallazgos sugieren una alteración funcional de los circuitos hipocampales que participan en la generación de

este ritmo, no obstante, la modificación de estos circuitos no repercute en el desempeño de los ratones en tareas conductuales dependientes de hipocampo, lo que es muy relevante, ya que denota una alteración electrofisiológica previa a la aparición de las alteraciones conductuales.

La actividad hipocampal theta es generada por las células piramidales en el área de CA1 (Amilhon et al., 2015), es por ello que con el objetivo de continuar con la caracterización del modelo, se realizó un estudio molecular del hipocampo en el que se observó un incremento en los niveles de fosforilación de la proteína Tau en el sitio S396 y T231 (Figura 13 y 15, respectivamente). Nuestros datos evidenciaron que la proteína Tau anormalmente fosforilada se localiza en el soma y en las proyecciones dendríticas de las neuronas piramidales del hipocampo (Figura 14 y 16). Cabe destacar que, aunque ambos sitios de fosforilación tienen distribución similar, en las neuronas piramidales de la región hipocampal CA1 existe un nivel incrementado de fosforilación en el sitio Tau pS396 comparado con el sitio T231 (Figura 17), lo que sugiere una progresión temporal en el curso de la fosforilación de la proteína Tau. De manera importante, estos datos correlacionan con lo reportado por Mondragón-Rodríguez y colaboradores en 2012 y 2014, en donde se reporta que los niveles de fosforilación en los sitios S396 y T231 se encuentran incrementados en etapas iniciales de la patología.

Presenilina 1 y proteína Tau

Existen diversos estudios en los que se evalúan los niveles de fosforilación de la proteína Tau en modelos animales con mutaciones en el gen de la PS1. El grupo de Kang en el 2005 encontró un incremento en la fosforilación de Tau en células madre embrionarias knock-out de PS1. También se ha encontrado que mientras la PS1 silvestre suprime la fosforilación de tau, las mutaciones en la PS1 $\Delta E9$, M146L, A246E y E280A incrementan la fosforilación de Tau en los sitios pS202 y pS396 en fibroblastos (Baki et al., 2004). Además los ratones transgénicos con las mutaciones I213T y A246E presentaron un incremento en los niveles de fosforilación de Tau en los sitios pS199 y pS396/404 dependientes de GSK-3 (Tanemura et al., 2006; Dewachter et al., 2008).

Por otro lado, la PS1 ha sido fuertemente relacionada con la actividad de la vía PI3K/Akt/ GSK3- β (Baki et al., 2004; Kang et al., 2005; Wang et al., 2012). El extremo

CTF de la N-cadherina es el sustrato directo de la PS1 (Huntley et al., 2002; Uemura et al., 2006), por tanto, un incremento de éste señala una pérdida de función de esta última. En nuestro modelo de estudio se encontró un incremento en los niveles del extremo CTF mediante la técnica de Western Blot, lo que se observa en la Figura 18, y correlaciona con lo reportado por Wang y colaboradores en 2006, en donde se reporta una disminución del procesamiento de la N-cadherina por la PS1 en un modelo con la mutación M146V.

Ya que la función de la PS1-M146V está afectada en el grupo 3xTgAD (Figura 18), se decidió evaluar los niveles de activación de la cinasa Akt, encontrando una disminución de la actividad de la misma (Figura 19), lo que correlaciona con el reporte de Baki et al., 2004 en el que se demostró que en ausencia de la PS1 existe una desregulación de la vía PI3K/Akt en cultivos celulares lo que genera un incremento en la actividad de la cinasa GSK3 β que a su vez fosforila a la proteína Tau en los sitios S396/404 y S202. Otro estudio similar fue realizado por Kang en 2005, en cultivos celulares carentes de PS1 y PS2, en el que se comprueba que la ausencia de la PS1 causa un incremento de fosforilación de la proteína Tau en los sitios S396/404. Además el grupo de Wang en el 2012 también reporta un incremento en la fosforilación de la proteína Tau en un modelo con la mutación V97L en el gen de la PS1 mediado por esta vía. En resumen, nuestros resultados señalan que la vía PI3K/Akt está desregulada a p30 y que la mutación M146V en el gen de la PS1 es un potencial generador de esta alteración en nuestro modelo de estudio.

Tomando en cuenta los resultados obtenidos en este trabajo, se comprueba la hipótesis que la mutación de la PS1-M146V en el modelo 3xTgAD a los 30 días de edad contribuye a la alteración los circuitos hipocampales de la siguiente manera: la PS1-M146V presenta un déficit en el procesamiento de la N-cadherina, indicando pérdida de función, la N-cadherina no incrementa su interacción con PI3K y por tanto la cinasa Akt es activada en menor medida. La cinasa Akt al estar menos activa, es incapaz de inactivar a GSK-3 β de manera similar al grupo NT, mientras que la GSK-3 β fosforila a la proteína Tau en los sitios pS396 y pT231. Finalmente, la proteína Tau fosforilada aumenta en las neuronas de la capa piramidal del hipocampo lo que correlaciona con

las alteraciones electrofisiológicas de los circuitos hipocampales observadas en nuestro trabajo (Figura 20).

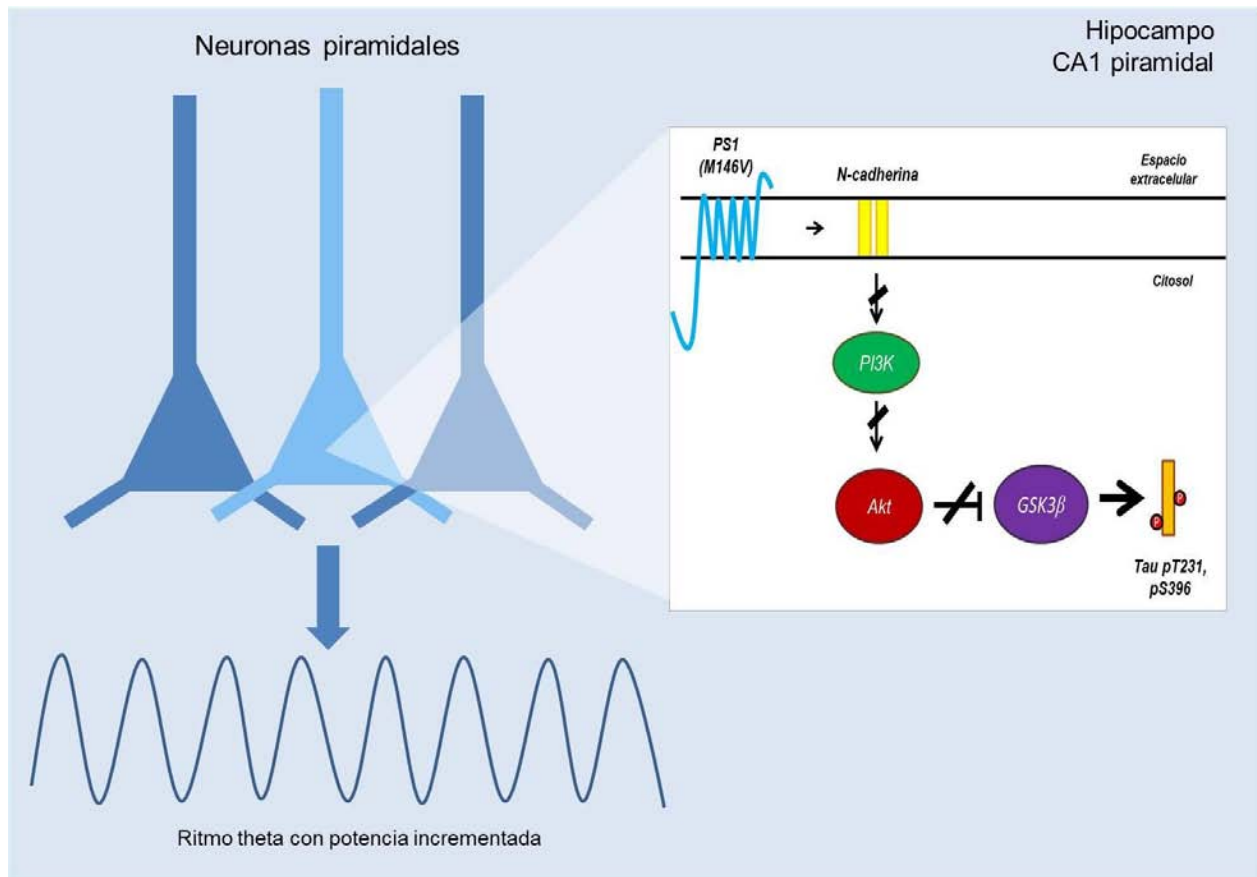


Figura 20. Representación esquemática de la posible contribución de la mutación M146V en PS1 a la alteración de los circuitos hipocampales en el modelo 3xTgAD. La M146V-PS1 se observa inserta en la membrana plasmática de las neuronas piramidales de la región hipocampal CA1 en donde procesa de forma deficiente la N-cadherina, ésta a su vez disminuye su interacción con PI3K desregulando a la cinasa Akt, que disminuye su actividad y causa un incremento en la actividad de la cinasa GSK3β que fosforila a la proteína Tau en los sitios S396 y T231. La proteína Tau pS396 y pT231 modifica la actividad hipocampal en el modelo 3xTgAD, causando una alteración en la actividad theta.

9. CONCLUSIONES

9.1 El modelo 3xTgAD no presenta alteraciones conductuales dependientes de hipocampo a la edad de 30 días.

9.2 Se encontró un incremento a nivel de potencia de la actividad theta hipocampal en el modelo 3xTgAD a los 30 días de edad.

9.3 Las neuronas piramidales de nuestro modelo presentan niveles de fosforilación incrementados en los sitios S396 y T231 de la proteína Tau.

9.4 El procesamiento de la N-cadherina por la PS1 se encuentra disminuido en el grupo 3xTgAD, por lo que la vía PI3K/Akt/GSK3 β se encuentra desregulada.

10. REFERENCIAS

- Aggarwal, N. T., R. C. Shah, et al. (2015). "Alzheimer's disease: Unique markers for diagnosis & new treatment modalities." Indian J Med Res 142(4): 369-382.
- Amaral, D. G. and M. P. Witter (1989). "The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data." Neuroscience 31(3): 571-591.
- Amilhon, B., C. Y. Huh, et al. (2015). "Parvalbumin Interneurons of Hippocampus Tune Population Activity at Theta Frequency." Neuron 86(5): 1277-1289.
- Arnold, S. E., B. T. Hyman, et al. (1991). "The topographical and neuroanatomical distribution of neurofibrillary tangles and neuritic plaques in the cerebral cortex of patients with Alzheimer's disease." Cereb Cortex 1(1): 103-116.
- Artavanis-Tsakonas, S., M. D. Rand, et al. (1999). "Notch signaling: cell fate control and signal integration in development." Science 284(5415): 770-776.
- Avila, J., J. J. Lucas, et al. (2004). "Role of tau protein in both physiological and pathological conditions." Physiol Rev 84(2): 361-384.
- Baki, L., J. Shioi, et al. (2004). "PS1 activates PI3K thus inhibiting GSK-3 activity and tau overphosphorylation: effects of FAD mutations." EMBO J 23(13): 2586-2596.
- Bancher, C., C. Brunner, et al. (1989). "Accumulation of abnormally phosphorylated tau precedes the formation of neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease." Brain Res 477(1-2): 90-99.
- Barghorn, S., P. Davies, et al. (2004). "Tau paired helical filaments from Alzheimer's disease brain and assembled in vitro are based on beta-structure in the core domain." Biochemistry 43(6): 1694-1703.
- Basar-Eroglu, C., C. Schmiedt-Fehr, et al. (2008). "Altered oscillatory alpha and theta networks in schizophrenia." Brain Res 1235: 143-152.
- Baudier, J., S. H. Lee, et al. (1987). "Separation of the different microtubule-associated tau protein species from bovine brain and their mode II phosphorylation by Ca²⁺/phospholipid-dependent protein kinase C." J Biol Chem 262(36): 17584-17590.
- Bergem, A. L., K. Engedal, et al. (1997). "The role of heredity in late-onset Alzheimer disease and vascular dementia. A twin study." Arch Gen Psychiatry 54(3): 264-270.
- Bhogal, P., C. Mahoney, et al. (2013). "The common dementias: a pictorial review." Eur Radiol 23(12): 3405-3417.
- Biel, M., C. Wahl-Schott, et al. (2009). "Hyperpolarization-activated cation channels: from genes to function." Physiol Rev 89(3): 847-885.
- Bierer, L. M., P. R. Hof, et al. (1995). "Neocortical neurofibrillary tangles correlate with dementia severity in Alzheimer's disease." Arch Neurol 52(1): 81-88.
- Bird, T. D. (1993). Alzheimer Disease Overview. GeneReviews(R). R. A. Pagon, M. P. Adam, H. H. Ardinger et al. Seattle (WA).
- Bohbot, V. D., M. S. Copara, et al. (2017). "Low-frequency theta oscillations in the human hippocampus during real-world and virtual navigation." Nat Commun 8: 14415.
- Bondareff, W., C. Harrington, et al. (1994). "Immunohistochemical staging of neurofibrillary degeneration in Alzheimer's disease." J Neuropathol Exp Neurol 53(2): 158-164.
- Booth, C. A., J. Witton, et al. (2016). "Altered Intrinsic Pyramidal Neuron Properties and Pathway-Specific Synaptic Dysfunction Underlie Aberrant Hippocampal Network Function in a Mouse Model of Tauopathy." J Neurosci 36(2): 350-363.
- Braak, E., H. Braak, et al. (1994). "A sequence of cytoskeleton changes related to the formation of neurofibrillary tangles and neuropil threads." Acta Neuropathol 87(6): 554-567.

- Braak, H. (1974). "On the structure of the human archicortex. I. The cornu ammonis. A Golgi and pigmentarchitectonic study." Cell Tissue Res 152(3): 349-383.
- Braak, H. and E. Braak (1991). "Neuropathological staging of Alzheimer-related changes." Acta Neuropathol 82(4): 239-259.
- Brion, J. P. (1998). "Neurofibrillary tangles and Alzheimer's disease." Eur Neurol 40(3): 130-140.
- Brookmeyer, R., M. M. Corrada, et al. (2002). "Survival following a diagnosis of Alzheimer disease." Arch Neurol 59(11): 1764-1767.
- Buzsaki, G. and E. I. Moser (2013). "Memory, navigation and theta rhythm in the hippocampal-entorhinal system." Nat Neurosci 16(2): 130-138.
- Cantero, J. L., M. Atienza, et al. (2003). "Sleep-dependent theta oscillations in the human hippocampus and neocortex." J Neurosci 23(34): 10897-10903.
- Caplan, J. B., J. R. Madsen, et al. (2003). "Human theta oscillations related to sensorimotor integration and spatial learning." J Neurosci 23(11): 4726-4736.
- Cleveland, D. W., S. Y. Hwo, et al. (1977). "Purification of tau, a microtubule-associated protein that induces assembly of microtubules from purified tubulin." J Mol Biol 116(2): 207-225.
- Colom, L. V., M. T. Castaneda, et al. (2005). "Characterization of medial septal glutamatergic neurons and their projection to the hippocampus." Synapse 58(3): 151-164.
- Colom, L. V. (2006). "Septal networks: relevance to theta rhythm, epilepsy and Alzheimer's disease." J Neurochem 96(3): 609-623.
- Cras, P., M. A. Smith, et al. (1995). "Extracellular neurofibrillary tangles reflect neuronal loss and provide further evidence of extensive protein cross-linking in Alzheimer disease." Acta Neuropathol 89(4): 291-295.
- Cruikshank, L. C., A. Singhal, et al. (2012). "Theta oscillations reflect a putative neural mechanism for human sensorimotor integration." J Neurophysiol 107(1): 65-77.
- Chen, Q., A. Nakajima, et al. (2008). "Loss of presenilin function causes Alzheimer's disease-like neurodegeneration in the mouse." J Neurosci Res 86(7): 1615-1625.
- Chiba, Y., E. Iseki, et al. (2016). "Early differential diagnosis between Alzheimer's disease and dementia with Lewy bodies: Comparison between (18)F-FDG PET and (123)I-IMP SPECT." Psychiatry Res 249: 105-112.
- Chow, V. W., M. P. Mattson, et al. (2010). "An overview of APP processing enzymes and products." Neuromolecular Med 12(1): 1-12.
- Chui, D. H., H. Tanahashi, et al. (1999). "Transgenic mice with Alzheimer presenilin 1 mutations show accelerated neurodegeneration without amyloid plaque formation." Nat Med 5(5): 560-564.
- De Strooper, B. (2007). "Loss-of-function presenilin mutations in Alzheimer disease. Talking Point on the role of presenilin mutations in Alzheimer disease." EMBO Rep 8(2): 141-146.
- Deacon, R. M. (2006). "Assessing nest building in mice." Nat Protoc 1(3): 1117-1119.
- Deacon, R. (2012). "Assessing burrowing, nest construction, and hoarding in mice." J Vis Exp(59): e2607.
- Deacon, R. (2012). "Assessing burrowing, nest construction, and hoarding in mice." J Vis Exp(59): e2607.

- DeKosky, S. T. and K. Marek (2003). "Looking backward to move forward: early detection of neurodegenerative disorders." Science 302(5646): 830-834.
- Dewachter, I., L. Ris, et al. (2008). "Modulation of synaptic plasticity and Tau phosphorylation by wild-type and mutant presenilin1." Neurobiol Aging 29(5): 639-652.
- Dolan, P. J., and G. V. Johnson (2010). "The role of tau kinases in Alzheimer's disease." Curr Opin Drug Discov Devel 13(5): 595-603.
- Drewes, G. (1997)., A. Ebneith, et al. "MARK, a novel family of protein kinases that phosphorylate microtubule-associated proteins and trigger microtubule disruption." Cell 89(2): 297-308.
- Dries, D. R. and G. Yu (2008). "Assembly, maturation, and trafficking of the gamma-secretase complex in Alzheimer's disease." Curr Alzheimer Res 5(2): 132-146.
- Endres, D., S. Maier, et al. (2017). "Altered Intermittent Rhythmic Delta and Theta Activity in the Electroencephalographies of High Functioning Adult Patients with Autism Spectrum Disorder." Front Hum Neurosci 11: 66.
- Fannon, A. M., and D. R. Colman (1996). "A model for central synaptic junctional complex formation based on the differential adhesive specificities of the cadherins." Neuron 17(3): 423-434.
- Fortini, M. E. (2002). "Gamma-secretase-mediated proteolysis in cell-surface-receptor signalling." Nat Rev Mol Cell Biol 3(9): 673-684.
- Galasko, D., S. D. Edland, et al. (1995). "The Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD). Part XI. Clinical milestones in patients with Alzheimer's disease followed over 3 years." Neurology 45(8): 1451-1455.
- Galvan, M., J. P. David, et al. (2001). "Sequence of neurofibrillary changes in aging and Alzheimer's disease: A confocal study with phospho-tau antibody, AD2." J Alzheimers Dis 3(4): 417-425.
- Garcia de Ancos, J., J., I. Correias, et al. (1993). "Differences in microtubule binding and self-association abilities of bovine brain tau isoforms." J Biol Chem 268(11): 7976-7982.
- Gerritsen, A. A., C. Bakker, et al. (2016). "Prevalence of Comorbidity in Patients With Young-Onset Alzheimer Disease Compared With Late-Onset: A Comparative Cohort Study." J Am Med Dir Assoc 17(4): 318-323.
- Giannakopoulos, P., F. R. Herrmann, et al. (2003). "Tangle and neuron numbers, but not amyloid load, predict cognitive status in Alzheimer's disease." Neurology 60(9): 1495-1500.
- Givens, B. S., and D. S. Olton (1990). "Cholinergic and GABAergic modulation of medial septal area: effect on working memory." Behav Neurosci 104(6): 849-855.
- Goedert, M., M. G. Spillantini, et al. (1989). "Cloning and sequencing of the cDNA encoding an isoform of microtubule-associated protein tau containing four tandem repeats: differential expression of tau protein mRNAs in human brain." EMBO J 8(2): 393-399.
- Golde, T. E. and S. G. Younkin (2001). "Presenilins as therapeutic targets for the treatment of Alzheimer's disease." Trends Mol Med 7(6): 264-269.
- Gomez-Isla, T., R. Hollister, et al. (1997). "Neuronal loss correlates with but exceeds neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease." Ann Neurol 41(1): 17-24.
- Goutagny, R., N. Gu, et al. (2013). "Alterations in hippocampal network oscillations and theta-gamma coupling arise before Abeta overproduction in a mouse model of Alzheimer's disease." Eur J Neurosci 37(12): 1896-1902.

- Grundke-Iqbal, I., K. Iqbal, et al. (1986). "Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology." Proc Natl Acad Sci U S A 83(13): 4913-4917.
- Hampel, H., A. Mitchell, et al. (2004). "Core biological marker candidates of Alzheimer's disease - perspectives for diagnosis, prediction of outcome and reflection of biological activity." J Neural Transm (Vienna) 111(3): 247-272.
- Hanger, D. P., B. H. Anderton, et al. (2009). "Tau phosphorylation: the therapeutic challenge for neurodegenerative disease." Trends Mol Med 15(3): 112-119.
- Hardy, J., and D. J. Selkoe (2002). "The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics." Science 297(5580): 353-356.
- Helzner, E. P., N. Scarmeas, et al. (2008). "Survival in Alzheimer disease: a multiethnic, population-based study of incident cases." Neurology 71(19): 1489-1495.
- Hernández, J. D. O., J., E. Juárez Aguilar, et al. (2015). "El hipocampo: neurogénesis y aprendizaje." Revista Médica de la Universidad Veracruzana 15(1): 20-28.
- Himmler, A. (1989). "Structure of the bovine tau gene: alternatively spliced transcripts generate a protein family." Mol Cell Biol 9(4): 1389-1396.
- Hori, S., J. Matsumoto, et al. (2013). "Alpha- and theta-range cortical synchronization and corticomuscular coherence during joystick manipulation in a virtual navigation task." Brain Topogr 26(4): 591-605.
- Huntley, G. W., O. Gil, et al. (2002). "The cadherin family of cell adhesion molecules: multiple roles in synaptic plasticity." Neuroscientist 8(3): 221-233.
- Hutton, M., F. Busfield, et al. (1996). "Complete analysis of the presenilin 1 gene in early onset Alzheimer's disease." Neuroreport 7(3): 801-805.
- Hyman, B. T., G. W. Van Hoesen, et al. (1984). "Alzheimer's disease: cell-specific pathology isolates the hippocampal formation." Science 225(4667): 1168-1170.
- Hyman, B. T., K. Marzloff, et al. (1993). "The lack of accumulation of senile plaques or amyloid burden in Alzheimer's disease suggests a dynamic balance between amyloid deposition and resolution." J Neuropathol Exp Neurol 52(6): 594-600.
- Ingelsson, M. (2004), H. Fukumoto, et al. "Early Abeta accumulation and progressive synaptic loss, gliosis, and tangle formation in AD brain." Neurology 62(6): 925-931.
- Irizarry, M. C. (2004). "Biomarkers of Alzheimer disease in plasma." NeuroRx 1(2): 226-234.
- Kahana, M. J., R. Sekuler, et al. (1999). "Human theta oscillations exhibit task dependence during virtual maze navigation." Nature 399(6738): 781-784.
- Kamenetz, F., T. Tomita, et al. (2003). "APP processing and synaptic function." Neuron 37(6): 925-937.
- Kang, D. E., I. S. Yoon, et al. (2005). "Presenilins mediate phosphatidylinositol 3-kinase/AKT and ERK activation via select signaling receptors. Selectivity of PS2 in platelet-derived growth factor signaling." J Biol Chem 280(36): 31537-31547.
- Kimberly, W. T., W. Xia, et al. (2000). "The transmembrane aspartates in presenilin 1 and 2 are obligatory for gamma-secretase activity and amyloid beta-protein generation." J Biol Chem 275(5): 3173-3178.
- Kimura, T., K. Ishiguro, et al. (2014). "Physiological and pathological phosphorylation of tau by Cdk5." Front Mol Neurosci 7: 65.
- Kovacs, G. G. (2016). "Molecular Pathological Classification of Neurodegenerative Diseases: Turning towards Precision Medicine." Int J Mol Sci 17(2).
- Kowalczyk, T., R. Bocian, et al. (2013). "The generation of theta rhythm in hippocampal formation maintained in vitro." Eur J Neurosci 37(5): 679-699.

- Kuperstein, I., K. Broersen, et al. (2010). "Neurotoxicity of Alzheimer's disease Abeta peptides is induced by small changes in the Abeta42 to Abeta40 ratio." EMBO J 29(19): 3408-3420.
- Laudon, H., E. M. Hansson, et al. (2005). "A nine-transmembrane domain topology for presenilin 1." J Biol Chem 280(42): 35352-35360.
- Lei, P., S. Ayton, et al. (2010). "Tau protein: relevance to Parkinson's disease." Int J Biochem Cell Biol 42(11): 1775-1778.
- Li, X., S. Dang, et al. (2013). "Structure of a presenilin family intramembrane aspartate protease." Nature 493(7430): 56-61.
- Lu, P., X. C. Bai, et al. (2014). "Three-dimensional structure of human gamma-secretase." Nature 512(7513): 166-170.
- Lue, L. F., Y. M. Kuo, et al. (1999). "Soluble amyloid beta peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease." Am J Pathol 155(3): 853-862.
- Llibre Rodriguez, J. J., J. J., C. P. Ferri, et al. (2008). "Prevalence of dementia in Latin America, India, and China: a population-based cross-sectional survey." Lancet 372(9637): 464-474.
- Ma, H. (2007)., S. Lesne, et al. "Involvement of beta-site APP cleaving enzyme 1 (BACE1) in amyloid precursor protein-mediated enhancement of memory and activity-dependent synaptic plasticity." Proc Natl Acad Sci U S A 104(19): 8167-8172.
- Mahar, I., M. S. Albuquerque, et al. (2016). "Phenotypic Alterations in Hippocampal NPY- and PV-Expressing Interneurons in a Presymptomatic Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease." Front Aging Neurosci 8: 327.
- Manseau, F., R. Goutagny, et al. (2008). "The hippocamptoseptal pathway generates rhythmic firing of GABAergic neurons in the medial septum and diagonal bands: an investigation using a complete septohippocampal preparation in vitro." J Neurosci 28(15): 4096-4107.
- Meador, K. J., J. L. Thompson, et al. (1991). "Behavioral state-specific changes in human hippocampal theta activity." Neurology 41(6): 869-872.
- Mejia-Arango, S. and L. M. Gutierrez (2011). "Prevalence and incidence rates of dementia and cognitive impairment no dementia in the Mexican population: data from the Mexican Health and Aging Study." J Aging Health 23(7): 1050-1074.
- Mesulam, M. M., E. J. Mufson, et al. (1983). "Central cholinergic pathways in the rat: an overview based on an alternative nomenclature (Ch1-Ch6)." Neuroscience 10(4): 1185-1201.
- Mondragon-Rodriguez, S., G. Basurto-Islas, et al. (2008). "Cleavage and conformational changes of tau protein follow phosphorylation during Alzheimer's disease." Int J Exp Pathol 89(2): 81-90.
- Mondragon-Rodriguez, S., R. Mena, et al. (2008). "Conformational changes and cleavage of tau in Pick bodies parallel the early processing of tau found in Alzheimer pathology." Neuropathol Appl Neurobiol 34(1): 62-75.
- Mondragon-Rodriguez, S., G. Basurto-Islas, et al. (2010). "Causes versus effects: the increasing complexities of Alzheimer's disease pathogenesis." Expert Rev Neurother 10(5): 683-691.
- Mondragon-Rodriguez, S., E. Trillaud-Doppia, et al. (2012). "Interaction of endogenous tau protein with synaptic proteins is regulated by N-methyl-D-aspartate receptor-dependent tau phosphorylation." J Biol Chem 287(38): 32040-32053.

- Mondragon-Rodriguez, S., G. Perry, et al. (2013). "Phosphorylation of tau protein as the link between oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and connectivity failure: implications for Alzheimer's disease." Oxid Med Cell Longev 2013: 940603.
- Mondragon-Rodriguez, S., S., G. Perry, et al. (2014). "Phosphorylation of tau protein at sites Ser(396-404) is one of the earliest events in Alzheimer's disease and Down syndrome." Neuropathol Appl Neurobiol 40(2): 121-135.
- Moodley, K. K. and D. Chan (2014). "The hippocampus in neurodegenerative disease." Front Neurol Neurosci 34: 95-108.
- Morley, J. E., S. A. Farr, et al. (2010). "A physiological role for amyloid-beta protein: enhancement of learning and memory." J Alzheimers Dis 19(2): 441-449.
- Mu, Y. and F. H. Gage (2011). "Adult hippocampal neurogenesis and its role in Alzheimer's disease." Mol Neurodegener 6: 85.
- Mucke, L. and D. J. Selkoe (2012). "Neurotoxicity of amyloid beta-protein: synaptic and network dysfunction." Cold Spring Harb Perspect Med 2(7): a006338.
- Mueller, S. G., M. W. Weiner, et al. (2005). "Ways toward an early diagnosis in Alzheimer's disease: the Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (ADNI)." Alzheimers Dement 1(1): 55-66.
- Nelson, P. T., I. Alafuzoff, et al. (2012). "Correlation of Alzheimer disease neuropathologic changes with cognitive status: a review of the literature." J Neuropathol Exp Neurol 71(5): 362-381.
- Nikitczuk, J. S., S. B. Patil, et al. (2014). "N-cadherin regulates molecular organization of excitatory and inhibitory synaptic circuits in adult hippocampus in vivo." Hippocampus 24(8): 943-962.
- Nizzari, M., S. Thellung, et al. (2012). "Neurodegeneration in Alzheimer disease: role of amyloid precursor protein and presenilin 1 intracellular signaling." J Toxicol 2012: 187297.
- Obregon, D., H. Hou, et al. (2012). "Soluble amyloid precursor protein-alpha modulates beta-secretase activity and amyloid-beta generation." Nat Commun 3: 777.
- Oddo, S., A. Caccamo, et al. (2003). "Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction." Neuron 39(3): 409-421.
- Olton, D. S., J. A. Walker, et al. (1982). "A disconnection analysis of hippocampal function." Brain Res 233(2): 241-253.
- Orta-Salazar, E., A. Feria-Velasco, et al. (2013). "Morphological analysis of the hippocampal region associated with an innate behaviour task in the transgenic mouse model (3xTg-AD) for Alzheimer disease." Neurología (English Edition) 28(8): 497-502.
- Palop, J. J. and L. Mucke (2010). "Amyloid-beta-induced neuronal dysfunction in Alzheimer's disease: from synapses toward neural networks." Nat Neurosci 13(7): 812-818.
- Papp, M. I. and T. Kovacs (2013). "Progression of Alzheimer-type neurofibrillary tangles is related to the proximodistal segments of the hemispheric arteries." Curr Alzheimer Res 10(8): 818-828.
- Perez-Cruz, C., M. W. Nolte, et al. (2011). "Reduced spine density in specific regions of CA1 pyramidal neurons in two transgenic mouse models of Alzheimer's disease." J Neurosci 31(10): 3926-3934.
- Prihar, G., R. A. Fuldner, et al. (1996). "Structure and alternative splicing of the presenilin-2 gene." Neuroreport 7(10): 1680-1684.

- Prince, M., D. Acosta, et al. (2008). "Ageing and dementia in low and middle income countries- Using research to engage with public and policy makers." Int Rev Psychiatry 20(4): 332-343.
- Prince, M., G. C. Ali, et al. (2016). "Recent global trends in the prevalence and incidence of dementia, and survival with dementia." Alzheimers Res Ther 8(1): 23.
- Probst, A., M. Tolnay, et al. (1996). "Pick's disease: hyperphosphorylated tau protein segregates to the somatoaxonal compartment." Acta Neuropathol 92(6): 588-596.
- Raghavachari, S., M. J. Kahana, et al. (2001). "Gating of human theta oscillations by a working memory task." J Neurosci 21(9): 3175-3183.
- Rawlins, J. N., J. Feldon, et al. (1985). "The effects of delaying reward on choice preference in rats with hippocampal or selective septal lesions." Behav Brain Res 15(3): 191-203.
- Rogaev, E. I., R. Sherrington, et al. (1995). "Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene." Nature 376(6543): 775-778.
- Rogers, J., N. R. Cooper, et al. (1992). "Complement activation by beta-amyloid in Alzheimer disease." Proc Natl Acad Sci U S A 89(21): 10016-10020.
- Scott, L., T. Kiss, et al. (2016). "Neuronal network activity in the hippocampus of tau transgenic (Tg4510) mice." Neurobiol Aging 37: 66-73.
- Schneider, A., J. Biernat, et al. (1999). "Phosphorylation that detaches tau protein from microtubules (Ser262, Ser214) also protects it against aggregation into Alzheimer paired helical filaments." Biochemistry 38(12): 3549-3558.
- Schultz, C. and M. Engelhardt (2014). "Anatomy of the hippocampal formation." Front Neurol Neurosci 34: 6-17.
- Seeman, P., and N. Seeman (2011). "Alzheimer's disease: beta-amyloid plaque formation in human brain." Synapse 65(12): 1289-1297.
- Serrano-Pozo, A., M. P. Frosch, et al. (2011). "Neuropathological alterations in Alzheimer disease." Cold Spring Harb Perspect Med 1(1): a006189.
- Serrano-Pozo, A., M. L. Mielke, et al. (2011). "Reactive glia not only associates with plaques but also parallels tangles in Alzheimer's disease." Am J Pathol 179(3): 1373-1384.
- Shen, J. and R. J. Kelleher, 3rd (2007). "The presenilin hypothesis of Alzheimer's disease: evidence for a loss-of-function pathogenic mechanism." Proc Natl Acad Sci U S A 104(2): 403-409.
- Shepherd, T. M., E. Ozarslan, et al. (2006). "Structural insights from high-resolution diffusion tensor imaging and tractography of the isolated rat hippocampus." Neuroimage 32(4): 1499-1509.
- Shin, J., S. B. Yu, et al. (2010). "Swedish mutation within amyloid precursor protein modulates global gene expression towards the pathogenesis of Alzheimer's disease." BMB Rep 43(10): 704-709.
- Siwek, M. E., R. Müller, et al. (2015). "Altered Theta Oscillations and Aberrant Cortical Excitatory Activity in the 5XFAD Model of Alzheimers Disease." Neural Plasticity 2015: 17.
- Soler, H., J. Dorca-Arevalo, et al. (2017). "The GABAergic septohippocampal connection is impaired in a mouse model of tauopathy." Neurobiol Aging 49: 40-51.
- Spasic, D., and W. Annaert (2008). "Building gamma-secretase: the bits and pieces." J Cell Sci 121(Pt 4): 413-420.
- Stephan, H. (1983). "Evolutionary trends in limbic structures." Neurosci Biobehav Rev 7(3): 367-374.

- Tandon, A., and P. Fraser (2002). "The presenilins." Genome Biol 3(11): reviews3014.
- Tanemura, K., D. H. Chui, et al. (2006). "Formation of tau inclusions in knock-in mice with familial Alzheimer disease (FAD) mutation of presenilin 1 (PS1)." J Biol Chem 281(8): 5037-5041.
- Thinakaran, G., D. R. Borchelt, et al. (1996). "Endoproteolysis of presenilin 1 and accumulation of processed derivatives in vivo." Neuron 17(1): 181-190.
- Thinakaran, G., and E. H. Koo (2008). "Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function." J Biol Chem 283(44): 29615-29619.
- Timm, T., D. Matera, et al. (2006). "Signaling from MARK to tau: regulation, cytoskeletal crosstalk, and pathological phosphorylation." Neurodegener Dis 3(4-5): 207-217.
- Torres-Lista, V. and L. Gimenez-Llort (2013). "Impairment of nesting behaviour in 3xTg-AD mice." Behav Brain Res 247: 153-157.
- Uemura, K., T. Kihara, et al. (2006). "Characterization of sequential N-cadherin cleavage by ADAM10 and PS1." Neurosci Lett 402(3): 278-283.
- Vann, S. D., C. Denby, et al. (2008). "Memory loss resulting from fornix and septal damage: impaired supra-span recall but preserved recognition over a 24-hour delay." Neuropsychology 22(5): 658-668.
- Wagner, U., M. Utton, et al. (1996). "Cellular phosphorylation of tau by GSK-3 beta influences tau binding to microtubules and microtubule organisation." J Cell Sci 109 (Pt 6): 1537-1543.
- Wang, R., B. Wang, et al. (2006). "Wild-type presenilin 1 protects against Alzheimer disease mutation-induced amyloid pathology." J Biol Chem 281(22): 15330-15336.
- Wang, Y., Z. Cheng, et al. (2012). "Val97Leu mutant presenilin-1 induces tau hyperphosphorylation and spatial memory deficit in mice and the underlying mechanisms." J Neurochem 121(1): 135-145.
- Wolfe, M. S., W. Xia, et al. (1999). "Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity." Nature 398(6727): 513-517.
- Wolfe, M. S. (2013). "Toward the structure of presenilin/gamma-secretase and presenilin homologs." Biochim Biophys Acta 1828(12): 2886-2897.
- Wu, L., P. Rosa-Neto, et al. (2012). "Early-onset familial Alzheimer's disease (EOFAD)." Can J Neurol Sci 39(4): 436-445.
- Yu, G., F. Chen, et al. (2000). "Mutation of conserved aspartates affects maturation of both aspartate mutant and endogenous presenilin 1 and presenilin 2 complexes." J Biol Chem 275(35): 27348-27353.
- Yu, J. Z., and M. M. Rasenick (2006). "Tau associates with actin in differentiating PC12 cells." FASEB J 20(9): 1452-1461.
- Zhang, S., N. Smailagic, et al. (2014). "(11)C-PIB-PET for the early diagnosis of Alzheimer's disease dementia and other dementias in people with mild cognitive impairment (MCI)." Cochrane Database Syst Rev(7): CD010386.

11. LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

	Página
Figura 1. A. Cromosoma humano 14. B. Diagrama esquemático de la topología membranal de la PS1.	2
Figura 2. Representación tridimensional del complejo de gamma secretasa	4
Figura 3. Fotomicrografía de una sección de la neocorteza cerebral de un Cerebro.	9
Figura 4. A. Cromosoma humano 17. B. Esquema de Proteína Tau.	11
Figura 5. Patrón espaciotemporal de la degeneración neurofibrilar.	14
Figura 6. A. Corte coronal de hipocampo. B. Región hipocampal CA1 .	16
Figura 7. Esquema de los circuitos hipocampales.	17
Figura 8. Esquema de las áreas hipocampales y sus aferencias.	18
Figura 9. Prueba de Nesting.	29
Figura 10. Prueba conductual laberinto en T.	31
Figura 11. Secuencia de pasos para obtener la preparación septo-hipocampal completa.	33
Figura 12. Registro electrofisiológico de campo. Área CA1 hipocampal, capa piramidal.	35
Figura 13. Evaluación de los niveles de fosforilación de la proteína Tau en el residuo S396 a p30.	37
Figura 14. Localización de proteína Tau fosforilada en el sitio S396.	38
Figura 15. Localización de proteína Tau fosforilada en el sitio T23.	39
Figura 16. Localización de proteína Tau fosforilada en el sitio T231.	40
Figura 17. Comparación de dos sitios de fosforilación de la proteína Tau en el ratón 3xTgAD.	41
Figura 18. Evaluación de los niveles de la proteína N-cadherina en el ratón 3xTgAD y el ratón NT.	43
Figura 19. Evaluación del porcentaje de Akt s473 en el ratón 3xTgAD y el ratón NT.	44
Figura 20. Representación esquemática de la posible contribución de la mutación M146V en PS1 a la alteración de los circuitos hipocampales en el modelo 3xTgA	48