



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

**Efecto de la administración de β A 42 sobre la actividad catecolaminérgica
en el hipocampo y sus implicaciones en la memoria de reconocimiento
contextual**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO(A) EN CIENCIAS

PRESENTA:

LUCIA LANDA NAVARRO

TUTOR(A) PRINCIPAL DE TESIS: DR. FEDERICO BERMÚDEZ RATTONI
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. MARTHA LILIA ESCOBAR RODRÍGUEZ
FACULTAD DE PSICOLOGÍA, UNAM

DRA. YAZMIN RAMIRO CORTÉS
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM

CD . MX. MAYO, 2019.



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.

Agradecimientos Académicos

Agradezco al posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM por su apoyo académico para la realización de mis estudios de maestría.

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Neurobiología del aprendizaje y la memoria a cargo del Dr. Bermúdez Rattoni, en el departamento de Neurociencia Cognitiva de la división de Neurociencias del Instituto de Fisiología Celular, UNAM. Apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y tecnología (CONACyT) CB 250870 y por el Programa de Apoyos a Proyectos de Investigación e Innovación tecnológica (PAPIIT-UNAM) IN208616.

El alumno Lucia Landa Navarro agradece al CONACyT por otorgar la beca nacional con el No. De registro de becario 677837 del periodo comprendido entre septiembre 2017 a mayo 2019.

Por último, pero no menos importante, quiero agradecer a mis sinodales el Dr. Julio Eduardo Roque Morán Andrade, la Dra. Selva Rivas Arancibia, la Dra. Martha Lilia Escobar Rodríguez, la Dra. Magdalena Guerra Crestpo y la Dra. Gohar Gevorgyan Markosian quienes se tomaron el tiempo de leer mi trabajo y enriquecerlo con sus comentarios.

Agradecimientos personales

Le agradezco a mi tutor el Dr. Federico Bermúdez Rattoni por su asesoría y por permitirme formar parte de su laboratorio.

A mi comité tutorial, la Dra. Martha Lilia Escobar Rodríguez y la Dra. Yazmín Ramiro Cortés, por sus comentarios que sin duda enriquecieron mi trabajo de maestría.

A la Dra. Perla del Rocío Moreno Castilla que nos solo me asesoró, sino que también me ofreció su apoyo y me ayudó a dirigir este proyecto.

A a mis padres que me han apoyado en todo para poder seguir con mis estudios y mis sueños.

A mis amigos que estuvieron desde antes de embarcarme en este proyecto y que han continuado conmigo incluso en los días más difíciles. Roxana, Ana Laura, Erika, Alonso y Arturo su amistad ha sido invaluable.

A los amigos que gane es estos dos años. Cintis, Lalo, Mili, Lore, Saúl y Andrés. Hicieron de estos los dos mejores años de mi vida. Gracias por estar ahí siempre para resolver dudas, para apoyarme en y por hacer del laboratorio un hogar.

Índice

Abreviaturas	VIII
Resumen	1
Abstract	2
1. Introducción	
1.1. Características generales de la Enfermedad de Alzheimer	3
1.2. Características histopatológicas de la EA. β A y Tau hiperfosforilada	4
1.3. Metabolismo y agregación del β A	5
1.4. Bases genéticas de la EA	8
1.5. Hipótesis en cascada del β A	9
1.6. Tratamiento de la EA	11
1.7. Modelos de la EA	11
1.8. Aprendizaje y memoria en la EA	13
1.9. El sistema catecolaminérgico en la EA	16
2. Antecedentes	18
3. Objetivo general	18
4. Objetivos específicos	19
5. Hipótesis	19
6. Metodología experimental	
6.1 Sujetos	19
6.2 Implantación de cánulas	20
6.3 Preparación y administración del β A 42.....	20
6.4 Inmunohistoquímica contra TH y MAP2	21
6.5 Cuantificación de la longitud de axones positivos a TH o MAP2 mediante estereología	22
6.6 Memoria de localización de objetos	24
i) Aparatos y objetos	24
ii) Protocolo de localización de objetos	25

iii) Índice de reconocimiento	26
6.7 Laberinto acuático de Morris	27
i) Aparatos	27
ii) Protocolo del laberinto acuático de Morris	28
iii) Análisis de la prueba de memoria de largo plazo del laberinto acuático de Morris	29
6.8 Sacrificio	29
6.9 Análisis estadístico	30
7. Resultados	
7.1 Efecto temporal de la administración de β A soluble y fibrilizada sobre las fibras catecolaminérgicas del hipocampo	30
7.2 Efecto de la administración de β A sobre la evocación de una tarea de OLM	35
7.3 Efecto de la administración de β A sobre la evocación de una tarea de memoria espacial	37
7.4 Efecto de la administración de β A sobre las fibras catecolaminérgicas del hipocampo previo a la evocación del laberinto acuático de Morris	40
8. Discusión	
8.1 Efecto temporal de la administración de β A soluble y fibrilizada sobre las fibras catecolaminérgicas del hipocampo	41
8.2 Efecto de la administración de β A sobre la evocación de una tarea de OLM	43
8.3 Efecto de la administración de β A sobre la evocación de una tarea de memoria espacial	44
8.4 Efecto de la administración de β A sobre las fibras catecolaminérgicas del hipocampo previo a la evocación del laberinto acuático de Morris	46
9. Conclusiones	48
10. Perspectivas	48

Abreviaturas

AICD: fragmento de dominio intracelular de APP

Ach: acetilcolina

APP: Proteína precursora de amiloide

apoE: lipoproteína E

β A: Beta amiloide

β A scr: Beta amiloide scramble

CA1: Cornus ammonis 1

CICUAL del IFC: Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del Instituto de Fisiología Celular

DA: Dopamina

EA: Enfermedad de Alzheimer

IDE: Enzima degradadora de insulina

IFC: Instituto de Fisiología Celular

i.p.: intraperitoneal

IR: índice de reconocimiento

INGER: Instituto Nacional de Geriátría

LC: Locus Coeruleus

L-DOPA: 3,4-dihidroxifenilalanina

LTD: Depresión a largo plazo

LTP: Potenciación a largo plazo

MAP2: proteína asociada a microtúbulos 2

MAPT: Tau humana

MAO: Monoamino oxidasa

NE: Noradrenalina o norepinefrina

NMDA: N-metil-D-aspartato

OLM: Memoria de Ubicación o Localización de Objetos

ORM: tarea de memoria de Reconocimiento de Objetos

PFA: paraformaldehído

PS1: Presinilina 1

PS2: Presinilina 2

ROI: Región de interés

sAPP α : fragmento N terminal soluble generado por la enzima α secretasa

sAPP β : fragmento C terminal soluble generado por la enzima β secretasa

SSI: solución salina isotónica

TBS: Trizma base salina

TH: tirosina hidroxilasa

3xTg AD: Triple transgénico para la Enfermedad de Alzheimer

VTA: Área ventral tegmental

WMM: Laberinto Acuático de Morris

Resumen

La enfermedad de Alzheimer es el tipo de demencia más prevalente en la actualidad. Entre sus características más importantes se encuentran el déficit cognitivo y la pérdida de memoria episódica. Ambas características asociadas a la deposición de agregados de beta amiloide (β A) y los ovillos neurofibrilares de Tau.

Algunos trabajos han reportado que la acumulación o administración exógena del péptido β A altera la neurotransmisión catecolaminérgica, revierte la potenciación a largo plazo a depresión a largo plazo y tiene efectos negativos sobre la memoria de reconocimiento mediada por la corteza. Recientemente se ha establecido que las alteraciones patológicas generadas por el β A en un modelo transgénico para la EA coinciden con un mal desempeño en tareas de reconocimiento de objetos y una disminución en la concentración de catecolaminas en la corteza insular. Por otro lado, algunos datos de nuestro laboratorio, señalan la importancia de la correcta liberación de catecolaminas en el hipocampo durante la codificación de la novedad contextual.

En este trabajo, evaluamos los efectos neurotóxicos de la administración intrahipocampal de β A 42 sobre el sistema catecolaminérgico y la evocación de memorias contextual/ espaciales. Nuestros resultados señalan que la administración aguda de β A 42 disminuye la longitud de las fibras catecolaminérgicas en el hipocampo, lo cual afecta el número de cruces en la memoria a largo plazo del laberinto acuático de Morris y la identificación de una localización novedosa en una tarea de localización de objetos. Sin embargo, nuestros resultados también apuntan a que la longitud de los axones catecolaminérgicos puede recuperarse días después de la administración de β A 42.

Estos hallazgos sugieren la relevancia del sistema catecolaminérgico en la EA para el desarrollo de blancos terapéuticos.

Abstract

Alzheimer's disease (AD) is the most prevalent type of dementia in the elderly. Its major characteristics are amyloid-beta ($A\beta$) aggregates, neurofibrillary tangles of hyperphosphorylated tau, synaptic failure and neuritic dystrophy that lead to cognitive impairment and memory loss.

It has been reported that increased $A\beta$ deposition or its exogenous administration reduces catecholaminergic neurotransmission, impairs recognition memory and converts long-term potentiation in long-term depression in the cerebral cortex and dorsal hippocampus. Recent evidence from our laboratory has shown that $A\beta$ pathologic alterations, in a transgenic mouse model for AD, coincide with catecholaminergic neurotransmission disruption and recognition memory impairment. Moreover, recently we have shown data that links catecholaminergic input into the hippocampus with the encoding of novel contextual information. In this paper, we aim to evaluate the effects of exogenous $A\beta$ administration on long-term spatial and contextual memory evocation and the induced changes in the catecholaminergic system.

We found that the intrahippocampal administration of $A\beta$ after memory acquisition and before evocation impairs spatial memory codification of novel contextual information and decreases TH + axons after 24 h, but not after eight days. Also, our analysis shows that no other fibers show decreased length.

Thus, our data suggest that catecholaminergic neurotransmission and spatial memory evocation are disrupted by intrahippocampal $A\beta$ administration. These findings suggest the importance of the catecholaminergic system in AD that is relevant for the development of new therapeutic targets.

1. Introducción

1.1 Características generales de la Enfermedad de Alzheimer.

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la forma de demencia progresiva más común en personas mayores de 65 años. Hasta 2018, la Alzheimer's Association reportó que aproximadamente 5.7 millones de estadounidenses padecen la EA (Association, 2018). A medida que la población mundial envejece esta enfermedad se ha convertido en un problema de salud serio. Nuestro país no es la excepción, los últimos censos han registrado un incremento en la población de adultos mayores de 60 años con respecto a niños de 0 a 4 años (Robledo et al., 2016).

En México, no se cuenta con cifras exactas de cuantas personas padecen esta enfermedad, pero según datos del Instituto Nacional de Geriátrica (INGER) en 2014 la prevalencia de enfermedades por demencia en el país era de 860,000 casos. Y se espera que para el 2050, 3 millones de adultos mayores padezcan esta enfermedad (Robledo et al., 2016).

La EA es mayormente caracterizada por un declive gradual de las habilidades cognitivas y pérdida de la memoria episódica (Smith et al., 2002; Viggiano et al., 2008). También se presentan alteraciones de la fluencia verbal y algunos síntomas neuropsiquiátricos como los son la depresión, cambios de humor y cambios de personalidad. La importancia de estos síntomas radica en que tienen un impacto directo sobre la vida de quienes padecen esta enfermedad, pues el declive en la funcionalidad suele ser tal que el paciente ya no es capaz realizar sus actividades cotidianas con naturalidad (Robledo et al., 2016; Selkoe et al., 2016).

1.2 Características histopatológicas de la EA: β A y Tau hiperfosforilada.

La EA tiene dos características histopatológicas principales: las placas amiloides o neuríticas mayormente constituidas por el péptido beta amiloide (β A) y los ovillos neurofibrilares constituidos por la proteína Tau en su estado hiperfosforilado (Murphy et al., 2010). El β A es un péptido de aproximadamente 4 KDa derivado de la proteólisis de la proteína precursora de amiloide (APP) (De-paula et al., 2012). APP es un grupo heterogéneo de glicoproteínas transmembranales ampliamente distribuidos en el sistema nervioso central de entre 695 a 770 aminoácidos; las neuronas suelen expresar la isoforma de 695 residuos. Cabe señalar que aunque se le considera una proteína de la membrana celular, APP también es abundante en organelos membranosos como la mitocondria, el retículo endoplasmático y el aparato de Golgi (De-paula et al., 2012; D J Selkoe, 2001).

Por otro lado, Tau es una proteína asociada a microtúbulos (MAP) cuya fosforilación da estabilidad a los polímeros de tubulina permitiendo el correcto ensamble del microtúbulo. Esto es importante ya que las MAP participan en la estabilidad del citoesqueleto, transporte axonal y plasticidad sináptica.

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

Aunque la Tau también tiene un papel importante en la EA, su aparición en el cerebro de los pacientes parece ser más tardía a la del péptido amiloide, por lo que se considera que los eventos patológicos que dan inicio su agregación son desencadenados mayormente por las alteraciones en el procesamiento y sobreproducción del β A (Armstrong, 2014; Hardy et al., 1992). Aunque cabe señalar, que los ovillos neurofibrilares se pueden presentar en otro tipo de demencias, como la demencia frontotemporal y la parálisis supranuclear progresiva (Bekris et al., 2010).

1.3 Metabolismo y agregación de β A.

Las diferentes isoformas de APP son metabolizadas mediante dos vías en las que participan 3 enzimas secretasas denominadas α , β y γ (Bekris et al., 2010).

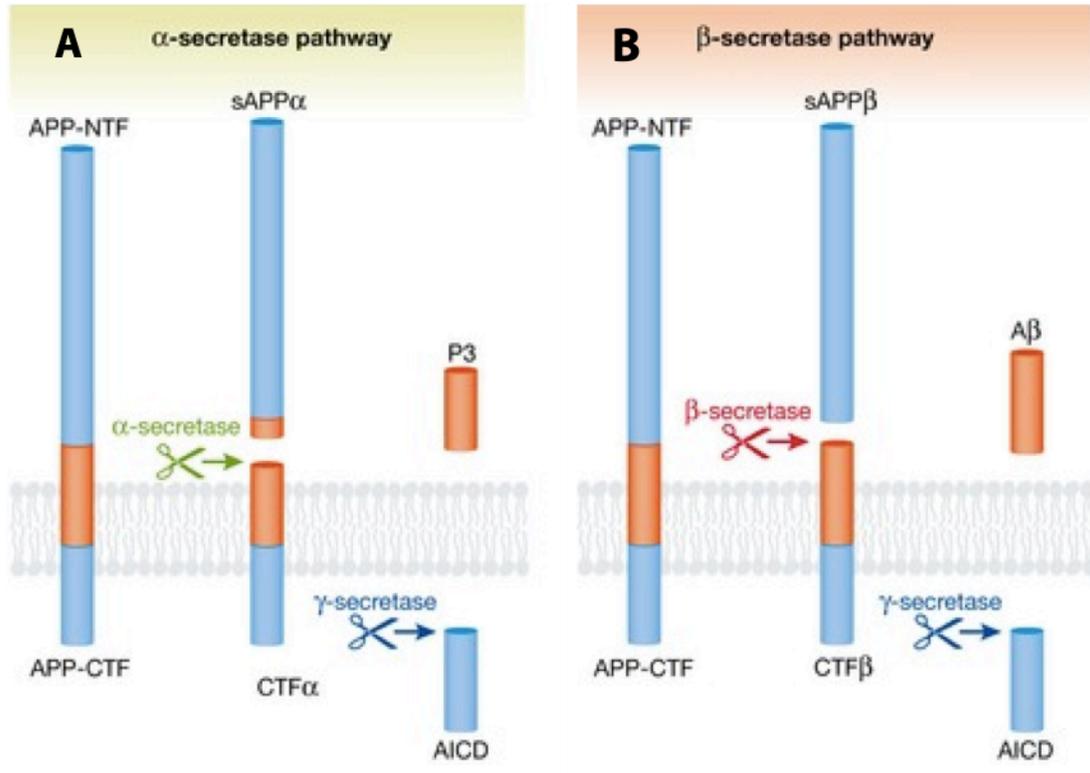


Fig 1. Metabolismo de la proteína precursora de amiloide (APP) mediante la vía no amiloidogénica y la vía amiloidogénica. A) Ruta no amiloidogénica y sus productos. B) Ruta amiloidogénica y sus productos. Las flechas y colores señalan el sitio de corte de cada enzima. Verde: α -secretasa, azul: γ -secretasa y Rojo: β -Secretasa. La NTF hace referencia al fragmento amino de la proteína y C al fragmento carboxilo. AICD se refiere al dominio intracelular de la proteína precursora de amiloide (Sasaguri et al., 2017).

En la vía secretora o no amiloidogénica, el primer corte es llevado a cabo por la enzima α -secretasa, lo que genera un fragmento N-terminal soluble (sAPP α) y un fragmento C-terminal de 83 residuos que posteriormente es cortado por la enzima intramembranal γ -secretasa para dar origen a un fragmento de bajo peso molecular denominado P3 y al fragmento de dominio intracelular de APP (AICD) (Fig.1A). Por otro lado, en la denominada vía amiloidogénica, el primer corte es producido por la enzima β -secretasa, lo que genera un fragmento N-

terminal (sAPP β) que se libera al espacio intracelular y un fragmento C- terminal de 99 residuos que se libera al espacio extracelular. El segundo corte, al igual que en la vía no amiloidogénica, es producido por la enzima γ - secretasa dando origen al AICD y a un péptido de composición heterogénea de entre 39 a 43 residuos denominado β A. (Fig.1B) (Baranello et al., 2015; Chow et al., 2010; De-paula et al., 2012). El péptido β A adquiere una estructura de beta plegada que tiene una tendencia a autoagregarse en dímeros, trímeros, oligómeros, protofibrillas, fibrillas y finalmente placas amiloides (Reinke & Gestwicki, 2011).

Aunque a partir de la proteólisis de APP se pueden obtener gran variedad de formas de β A, existen dos formas especialmente importantes, el β A40 que es la forma con mayor prevalencia, y el β A42 que tiene más tendencia a agregarse y por lo tanto formar placas amiloides (Mucke et al., 2012; Rammes et al., 2015). Es probable que esto se deba a los dos aminoácidos extra en el péptido β A42 que son de naturaleza hidrofóbica, lo que no solo favorece su agregación, sino también su interacción con otras moléculas hidrofóbicas como los lípidos de membrana, lo que puede comprometer la estructura de las membranas celulares y generar espacios por los que pueden pasar iones generándose excitotoxicidad, estrés oxidativo e inflamación (Giorgetti et al., 2018; Mucke et al., 2012). Además existen varios reportes que señalan a la forma β A 42 como la forma más tóxica para la plasticidad sináptica (Moreno-Castilla et al., 2016; Mucke et al., 2012; Selkoe, 2002).

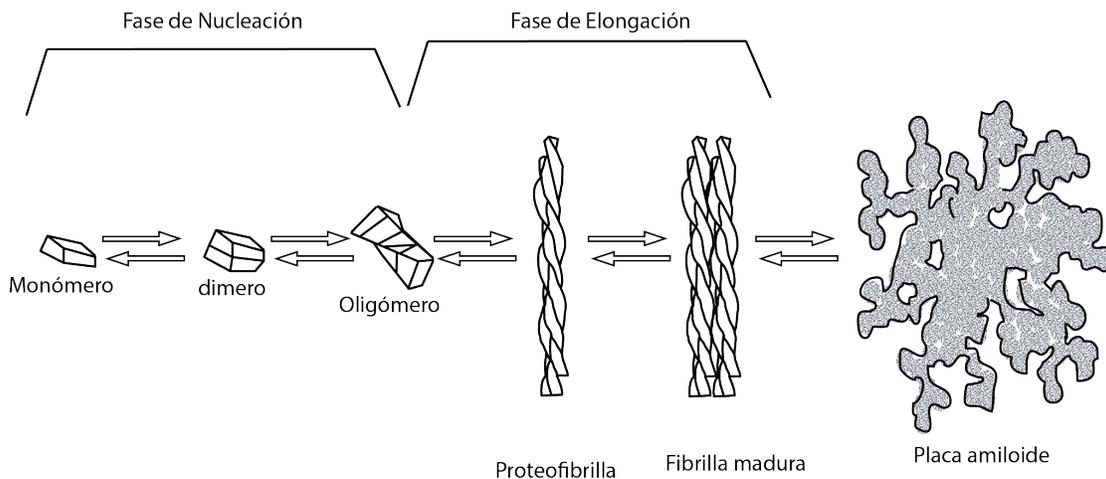


Fig 2. Proceso de agregación de β A. Se señalan los estados pertenecientes a las fases de nucleación y elongación. Las flechas en ambos sentidos indican el equilibrio que existe entre los diferentes estados de agregación de β A. Las placas amiloides o neuríticas no pertenecen a ninguna de las fases de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

La formación de las fibrillas de β A sigue una función sigmoide a lo largo del tiempo con dos fases esenciales. La primera es la fase de nucleación en la cual se forman estructuras secundarias beta de la proteína o monómeros. Esta fase culmina con la formación de oligómeros (Fig. 2). Durante la segunda fase, que es más rápida, se da la elongación; en ésta los oligómeros formados sirven de base para la unión de más oligómeros hasta formar estructuras fibrilares (Benseny-Cases et al., 2007). Adicionalmente se han descrito procesos de nucleación secundarios y de fragmentación de las fibras los cuales favorecen la agregación de β A (Giorgetti et al., 2018).

Dado que el crecimiento y la formación de fibrillas *in vitro* es dependiente de la concentración de monómeros, y que la actividad tóxica del péptido parece estar asociada a los oligómeros, se propone que las placas amiloides fungan como reservorio de estos; manteniendo así el estado patológico inducido por las altas concentraciones de las formas oligoméricas de β A (Mucke et al., 2012; Murphy et al., 2010).

1.4 Bases genéticas de la EA

Aunque la EA es considerada una patología multifactorial y heterogénea cuya etiología aun es desconocida, suele subdividírsele en dos tipos: hereditaria y esporádica (Selkoe, 2001). El tipo hereditario de la EA se caracteriza porque la sintomatología suele presentarse de manera temprana, entre los 40 y 60 años de edad, y está asociado a mutaciones en los genes APP, Presenilina 1 (PS1) y Presenilina 2 (PS2) (Ridge et al., 2013). La herencia es de tipo autosómico dominante y la progresión de la patología depende en gran medida de la mutación presentada por el paciente (Bekris et al., 2010; Ridge et al., 2013).

Por otro lado, la EA de tipo esporádico se presenta de forma más tardía, de los 65 años en adelante, y representa alrededor del 99% de los casos de la enfermedad (Holtzman et al., 2011). También se encuentra influenciada por factores genéticos, sin embargo se han identificado múltiples factores de riesgo no genéticos ligados a esta forma de la EA (Ridge et al., 2013; Robledo et al., 2016). Uno de los factores genéticos más importantes son los polimorfismos asociados al gen que codifica para la lipoproteína E (apoE) que está involucrada en el transporte del colesterol y en la degradación del β A (Kim et al., 2009; Selkoe et al., 2016). De especial importancia es la forma de apoE con el alelo 4, pues una sola copia de este alelo incrementa la posibilidad de padecer la EA 3 veces y dos copias incrementan la posibilidad por 12 (Holtzman et al., 2011).

Otros factores de riesgo asociados a la EA de tipo esporádico son la dislipidemia, diabetes mellitus, la falta de actividad física y la obesidad entre otros (Robledo et al., 2016). Los padecimientos antes mencionados están ligados con desregulaciones en las enzimas que participan en la degradación del β A, como lo son la apoE y en la enzima degradadora de insulina, por lo que se sugiere que la EA de tipo esporádico está ligada a una afectación en las vías de degradación del β A (Holtzman et al., 2011), y la EA de tipo hereditario con la sobreproducción del péptido (Selkoe, 2001).

1.5 Hipótesis en cascada del β A

Hasta el momento la hipótesis más aceptada acerca de la etiología de la EA es la que plantea al exceso del péptido β A en el sistema nervioso central, como el desencadenante de los eventos patológicos de la enfermedad (Armstrong, 2014; Selkoe & Hardy, 2016).

Originalmente, la cascada de eventos propuesta en 1992 por Hardy y Higgins plantea que la acumulación extracelular del β A generada por las mutaciones en APP, PS1 y 2; la presencia del alelo 4 de la apoE y algunos otros factores que afectan la degradación del péptido, son los eventos patológicos desencadenantes de la EA. Así, la agregación del β A llevaría entonces a su acumulación en placas y esto a su vez desencadenaría el mal plegamiento de Tau, una respuesta inflamatoria exacerbada, pérdida de dendritas, estrés oxidativo, excitotoxicidad y finalmente muerte neuronal (Hardy et al., 1992) (Fig.3).

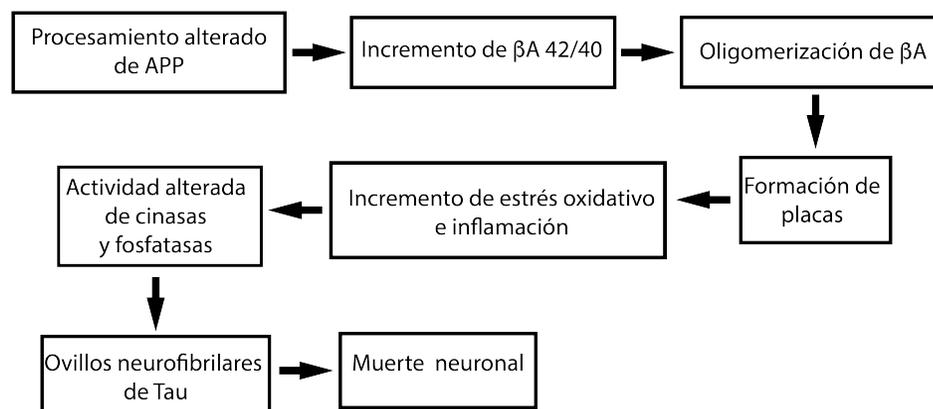


Fig 3. Resumen de la hipótesis en cascada de β A (modificado de Platt et al., 2013).

Los estudios más recientes apoyan la vigencia de la hipótesis en cascada como la explicación dominante de la etiología de la EA, pues se ha determinado que las mutaciones en APP favorecen la agregación del péptido, mientras que las

mutaciones en la PS1 incrementan la producción del β A 42. Además, se han vinculado nuevos genes de riesgo a la EA de tipo esporádica, la mayoría asociados a la respuesta inmune generada por la agregación del péptido amiloide, transportadores de lípidos y al reciclaje endosomal de vesículas involucradas con la degradación del β A (Selkoe et al., 2016).

Cabe señalar, que la hipótesis en cascada del β A ha sufrido modificaciones importantes, por ejemplo la hipótesis original consideraba a las fibrillas y placas amiloides como las formas más tóxicas de este péptido (Hardy et al., 1992). Sin embargo, nuevos estudios ahora sugieren a los oligómeros como la forma más tóxica. Diversos reportes señalan que los oligómeros de β A se asocian con déficit cognitivo temprano y alteraciones en la plasticidad sináptica (Armstrong, 2014; Selkoe, 2002).

1.6 Tratamientos de la EA.

Los fármacos aprobados hasta ahora para tratar la EA se enfocan más en aliviar los síntomas que en detener su progreso. A partir del surgimiento de la hipótesis colinérgica, que señala que las primeras neuronas en afectarse durante la EA son aquellas situadas en el cerebro basal anterior (Davies et al., 1976; Perry et al., 1977), se derivó el tratamiento con donezepilo, galantamina, rivastigmina o tracrina que son inhibidores de la degradación de acetilcolina (ACh) (Galimberti et al., 2013). También suele tratarse a los pacientes con antagonistas del receptor NMDA como la memantina; esto debido a que durante la EA existe sobre activación de este receptor ya que se presenta un exceso de glutamato por oxidación de la glutamina sintetasa (Castellani et al., 2010) y porque los oligómeros de β A alteran el flujo de calcio a través del receptor NMDA (Shankar et al., 2007).

Algunas propuestas de tratamiento incluyen a los fármacos que modulan la actividad de las enzimas secretasas que participan en la vía amiloidogénica. Sin embargo, estos tratamientos no mejoraron la capacidad cognitiva de los pacientes y tienen la desventaja de que estas enzimas rara vez degradan

sustratos específicos (De-paula et al., 2012; Schneider, 2013). Otros tratamientos que se enfocan en la acumulación del β A, son los anticuerpos monoclonales que buscan reducir la carga de este péptido en el cerebro. En la actualidad son la mejor propuesta de tratamiento pues muestran de manera dosis dependiente mejora cognitiva moderada y una menor carga del β A en el cerebro (Giorgetti et al., 2018; Sevigny et al., 2016).

1.7 Modelos de la EA

El desarrollo de modelos animales que emulen las diferentes características patológicas o conductuales de la EA, es importante ya que nos permiten no sólo obtener más información acerca de cómo se desarrolla esta enfermedad, sino que también nos permite proponer estrategias que ayuden a tratarla. En particular para la EA existen dos diferentes tipos de modelos: los modelos transgénicos y los modelos de neurotoxicidad de β A, en estos últimos el péptido es administrado de manera exógena.

Entre los modelos más utilizados están los modelos transgénicos que sobreexpresan APP humana, y en los que además de presentarse mutaciones en APP también existen mutaciones en PS1; lo que acelera la acumulación de β A y genera déficits cognitivos. Incluso se han generado modelos como el triple transgénico para EA que tiene una mutación en APP, otra en PS1 y otra en el gene que codifica para Tau humana (MAPT) para la acumulación de ovillos neurofibrilares. Cabe señalar, que esta última mutación no se ha vinculado con pacientes de la EA, sino con pacientes que padecen demencia frontotemporal (Sasaguri et al., 2017).

Aunque los modelos transgénicos son útiles porque suelen recapitular la acumulación de β A y Tau en el cerebro de los pacientes, la inserción de múltiples genes puede generar condiciones artificiales. Además son un mejor modelo para emular la EA de tipo hereditaria, que representa tan solo al 1% de los casos (Hall et al., 2012). En búsqueda de mejores modelos para la EA de tipo esporádica se han creado modelos con ApoE4 humana que facilitan la

deposición de β A siempre y cuando el modelo tenga también mutaciones en APP y PS1 (Liu et al., 2017).

En la actualidad destacan los modelos de transgénesis viral, en los cuales mediante el uso de lentivirus y adenovirus se insertan genes asociados a mutaciones en APP y PS1 en un área cerebral de interés (Audrain et al., 2018; Platt et al., 2013). De estos modelos han surgido algunas evidencias importantes que refuerzan la hipótesis en cascada de β A. En al menos uno de estos modelos, los déficits cognitivos reportados coinciden con el incremento gradual de la producción de β A 42 y aberraciones en la plasticidad sináptica. Además el progreso de la patología amiloide eventualmente desemboca en la fosforilación anormal de Tau y su acumulación (Audrain et al., 2018). Si bien, estos modelos tienen la ventaja de que la modificación de genes es somática y puede realizarse en animales silvestres, una de sus críticas es que siguen valiéndose de mutaciones que solo se encuentran en la EA de tipo hereditaria para inducir la patología (Platt et al., 2013).

Por su lado, los modelos de neurotoxicidad de β A permiten evaluar el efecto tóxico de los agregados de β A en el cerebro y en la conducta sin necesidad de la inserción de genes (Zussy et al., 2011a). Dichos modelos de administración de β A 42 o del fragmento de β A 25-35 han demostrado que tras la administración de agregados fibrilares existen déficits cognitivos, aumento del estrés oxidativo, daño neuronal (Sharma et al., 2016), sobreactivación de caspasas, incremento del procesamiento de APP por la vía amiloidogénica (Zussy et al., 2011a), disminución de neuronas colinérgicas en el cerebro basal anterior y un patrón de gliosis similar al de pacientes con la EA (McLarnon, 2014; Wong et al., 2016). Además en este tipo de modelo no se observan los procesos compensatorios que se pueden presentar en los modelos transgénicos (Chakroborty et al., 2012; Jean et al., 2015).

1.8 Aprendizaje y memoria en la EA

La memoria se define como la adquisición, codificación, almacenamiento y la posterior recuperación de información relevante del medio. El almacenamiento de la información se lleva a cabo mediante un proceso llamado consolidación, que implica cambios moleculares que permiten la perdurabilidad del trazo de memoria. La recuperación de la información se lleva a cabo por el proceso de evocación, que implica la reactivación del trazo derivada de la interacción entre la información almacenada y nueva información ambiental (Roediger et al., 2007).

La consolidación y el almacenamiento de la información adquirida confiere cambios moleculares y físicos a nivel de la sinapsis que pueden desencadenar cascadas de señalización celular, cambios en la expresión de genes y síntesis de proteínas. Esto puede llevar a cambios plásticos que inducen un fortalecimiento o facilitación de la comunicación neuronal a largo plazo, la cual es conocida como potenciación a largo plazo (LTP). Hasta ahora la LTP, y su contraparte la depresión a largo plazo (LTD) son el modelo neurofisiológico más aceptado de cómo se lleva a cabo el aprendizaje en el cerebro (Langille et al., 2018; Nicoll, 2017).

El déficit cognitivo en la EA se ha ligado a alteraciones en los procesos de plasticidad sináptica que subyacen al aprendizaje (Langille et al., 2018; Selkoe, 2002). Múltiples grupos de investigación han reportado que la presencia de oligómeros de β A es suficiente para inhibir (Klyubin et al., 2005; Mucke et al., 2012) o impedir el mantenimiento de la LTP (Selkoe, 2002). Además, también se asocia la presencia de oligómeros de β A con la reducción de espinas dendríticas y pérdida de sinapsis (Shankar et al., 2007; Sheng et al., 2012); lo cual se relaciona con el progreso de la patología y la aparición de síntomas clínicos como el daño cognitivo leve y la amnesia (Langille et al., 2018; Sperling et al., 2010).

El estudio de los procesos plásticos que ocurre en la sinapsis, tanto en sujetos

sanos como enfermos, nos permite entender como se transmite la información y se comunican diferentes áreas del cerebro formando circuitos que procesan conductas complejas como el aprendizaje. Entre los primeros síntomas de la EA se encuentra la pérdida de memoria episódica (capacidad de recordar experiencias personales) y los problemas de orientación. Esto se debe a que este tipo de memorias se procesan en el lóbulo temporal medial (hipocampo, amígdala y cortezas parahipocampal, perirrinal y entorrinal) (Kandel et al., 2014); que durante la EA se ve severamente afectado por la acumulación de proteínas y muerte neuronal. Además, se reporta que la actividad del hipocampo en pacientes con la EA se encuentra reducida durante la codificación de estímulos novedosos (Sperling et al., 2010).

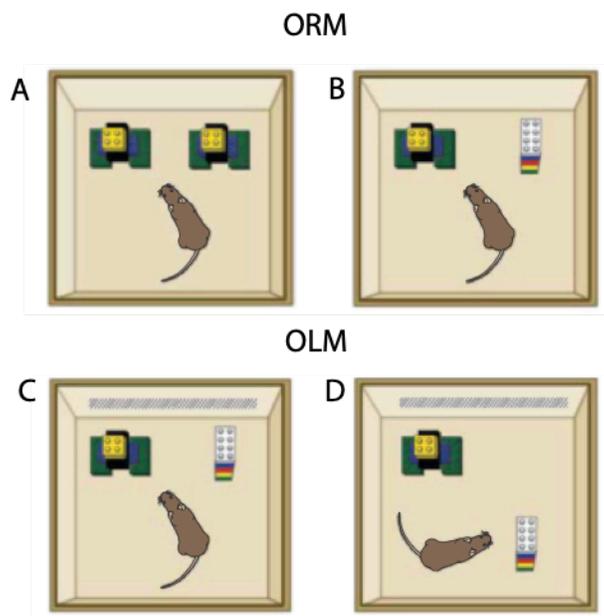


Fig 4. Tareas de memoria de reconocimiento en animales. A) Adquisición de la tarea de reconocimiento de objetos (ORM). **B)** Memoria largo plazo, cambio de un objeto por otro novedoso. **C)** Adquisición de la tarea de localización de objetos (OLM). **D)** Memoria a largo plazo, cambio de localización de uno de los objetos (Moreno-Castilla et al., 2018).

Una parte importante de la memoria episódica es la memoria de reconocimiento, que se define como la habilidad para identificar si un estímulo o situación ha sido

experimentado previamente (Moreno-Castilla et al., 2018). Para poder estudiar este tipo de memoria en animales existen paradigmas conductuales como la tarea de reconocimiento de objetos (ORM) y la tarea de localización de objetos (OLM); análogos a las tareas de reconocimiento visuales aplicadas a pacientes con EA (Creighton et al., 2019).

En la tarea de ORM que apela al componente de la familiaridad del estímulo; se permite que el sujeto se familiarice con dos objetos iguales (Fig. 4A), y posteriormente uno de los objetos se substituye por uno novedoso (Fig. 4B). Se esperaría que el sujeto al notar el objeto nuevo lo explorara más, determinando así que es capaz de distinguir la novedad en un contexto familiar. Mientras tanto, en la tarea de OLM, en vez de substituir uno de los objetos por otro novedoso, uno de los objetos es desplazado a una localización novedosa (Fig. 4D). Una vez más se espera que de reconocer el cambio en el contexto, el animal explore más el objeto con localización novedosa (Moreno-Castilla et al., 2018).

Diferentes estudios han mostrado que al igual que los pacientes con EA, los modelos murinos de la EA presentan una incapacidad para identificar objetos novedosos o con localización novedosa conforme la acumulación de β A (Guzmán-Ramos et al., 2012) y Tau progresa (Creighton et al., 2019). En estos modelos de la EA también se han reportado déficits en memoria de tipo espacial dependientes de hipocampo como el laberinto acuático de Morris (MWM), en el cual los ratones son entrenados a encontrar una plataforma sumergida con base en claves espaciales (Himeno et al., 2011).

1.9 El sistema catecolaminérgico en la EA

Aunque gran parte de los estudios que describen deficiencias en la memoria y mecanismos neurodegenerativos de la EA se enfocan en el sistema colinérgico, recientemente se han reportado que otros sistemas de neurotransmisión también se encuentran afectados. Entre éstos, los sistemas dopaminérgico y noradrenérgico que participan de manera importante en procesos cognitivos y de plasticidad sináptica (Martorana et al., 2014; Trillo et al., 2013). Algunos estudios

en pacientes con EA reportan una disminución significativa de dopamina (DA) y L-DOPA en cerebro (Storga et al., 1996) y líquido cefalorraquídeo; mientras la cantidad de noradrenalina (NE) parece estar aumentada (Stefani et al., 2015); esto correlaciona con reportes que indican que la enzima dopamina beta hidroxilasa se encuentra incrementada en etapas tardías de la EA (Mustapic et al., 2013). También se han descrito déficits de memoria correlacionados a una marcada reducción de los receptores de DA D1 (Cortés et al., 1988) y D2 en el hipocampo (Kempainen et al., 2003). Sin embargo, aún no queda claro si las alteraciones en ambos sistemas catecolaminérgicos estaban presentes antes de la EA o son consecuencia de ésta (Martorana et al., 2014). Cabe señalar, que pacientes con la EA que fueron tratados con un protocolo de estimulación magnética transcraneal en conjunto con un agonista dopaminérgico presentaron recuperación de la eficiencia en la plasticidad sináptica y mejoras en pruebas de memoria (Koch et al., 2014).

En modelos animales de la EA se ha establecido una relación entre la acumulación de β A, déficits cognitivos, disfunción sináptica y la aparición de alteraciones en el sistema dopaminérgico (Guzmán-Ramos et al., 2012; Jürgensen et al., 2011; Moreno-Castilla et al., 2016; Nobili et al., 2017). La presencia de oligómeros de β A en el hipocampo resulta en la pérdida de terminales catecolaminérgicas y se asocia con la degeneración de somas del área ventral tegmental (VTA), déficits cognitivos en tareas contextuales y alteraciones en la plasticidad sináptica (Nobili et al., 2017). Esto es importante debido a que experimentos recientes en nuestro laboratorio indican que la liberación de DA y NE en el hipocampo es importante durante la evocación de una tarea que evalúa el componente contextual de la memoria de reconocimiento (Moreno-Castilla et al., 2017).

Por otro lado, está reportado que diferentes tratamientos con precursores o agonistas catecolaminérgicos como la L-DOPA (Ambrée et al., 2009; Nobili et al., 2017), apomorfina (Himeno et al., 2011), inhibidores de la recaptura de DA y NE (Guzmán-Ramos et al., 2012) e inhibidores de la monoamina oxidasa B (MAO-B)

tienen un efecto benéfico sobre los déficits cognitivos y la acumulación del β A en modelos transgénicos para la EA. Además, el tratamiento con agonistas dopaminérgicos evita la internalización de los receptores necesarios para inducir la LTP (Jürgensen et al., 2011; Nobili et al., 2017).

Recientemente se ha descrito que la presencia de oligómeros de β A es suficiente para generar una reducción en los niveles de DA y la pérdida de terminales catecolaminérgicas en la corteza insular, además de revertir la LTP a LTD en la vía de la corteza insular a la amígdala (Moreno-Castilla et al., 2016).

2. Antecedentes

La memoria de reconocimiento se ve severamente afectada conforme la EA progresa. Diferentes estudios han ligado la incapacidad de reconocer estímulos novedosos con alteraciones en el sistema catecolaminérgico, que es uno de los sistemas más relevantes para procesos de aprendizaje y memoria. A su vez, en los últimos años, grupos de investigación han demostrado un vínculo entre la degeneración de los sistemas catecolaminérgicos y la patología temprana de la EA.

El exceso en la producción oligómeros del β A se ha relacionado con la pérdida de terminales catecolaminérgicas, el deterioro en la memoria de reconocimiento y alteraciones en la plasticidad sináptica tanto en pacientes como en modelos animales de la EA. Aunque cabe señalar, que también existen reportes que indican que fármacos que incrementan la neurotransmisión dopaminérgica pueden mitigar los efectos dañinos del β A sobre la cognición y la acumulación de dicho péptido.

Una de las estructuras que se ve severamente afectada por este tipo de alteraciones es el hipocampo, en el cual las catecolaminas son importantes para la codificación de la novedad contextual. Por lo que, este proyecto plantea evaluar los efectos que la administración de oligómeros/fibrillas de β A42 en el

hipocampo de roedores pudiera tener sobre estos sistemas y sobre una memoria de reconocimiento espacial/contextual.

3. Objetivo general

Elucidar el efecto de la administración de oligómeros y fibrillas de β A42 sobre las terminales catecolaminérgicas y la plasticidad sináptica en el hipocampo, así como su efecto sobre la novedad contextual y la evocación de memorias espaciales/contextuales.

4. Objetivos específicos

- Determinar el efecto y la temporalidad que tiene la administración aguda de oligómeros/fibrillas de β A42 sobre las terminales catecolaminérgicas del hipocampo.
- Evaluar los efectos que tiene la administración de oligómeros/fibrillas de β A42 en el hipocampo sobre el componente contextual y espacial de la memoria de reconocimiento.

5. Hipótesis

La acumulación de oligómeros y fibrillas β A genera la pérdida de terminales catecolaminérgicas en el hipocampo, lo que a su vez altera la plasticidad sináptica en esta estructura afectando la evocación de memorias espaciales y la novedad contextual.

6. Metodología experimental

6.1 Sujetos

Los sujetos empleados para el desarrollo de este trabajo fueron ratones

B6129SF2/J WT macho de entre 5 y 6 meses de edad. Los animales se mantuvieron en el vivario del Instituto de Fisiología Celular (IFC) en cajas individuales o por parejas, en condiciones de 12 h luz/ 12 h oscuridad y tuvieron acceso libre a comida y agua en todo momento.

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

6.2 Implantación de cánulas.

La cirugía se realizó en un aparato estereotáxico para roedores bajo anestesia inhalada (isoflurano) aproximadamente al 0.5%. Se implantaron cánulas de 7 mm de largo sobre CA1 del hipocampo en las coordenadas AP: -2.5 ML:+1.5 DV: -1.4 (Atlas, 2009). Dichas cánulas se fijaron con pegamento yacrílico dental. Tras la cirugía se dieron 7 días de recuperación a todos los animales antes de comenzar con las pruebas de conducta.

6.3 Preparación y administración del β A 42.

El péptido β A42 puro (Millipore, California, U.S.A.) se resuspendió en NH_4OH al 1% a una concentración de 1mg/mL. Dicha solución fue sonicada por un minuto para permitir que cualquier agregado se deshiciera, quedando únicamente monómeros y oligómeros de bajo peso en una suspensión stock. La solución denominada β A soluble se obtuvo diluyendo la suspensión stock en solución salina isotónica al 0.9% (SSI) y la solución denominada β A 42 fibrilizada se obtuvo incubando la solución diluida en SSI por 4 días a 37°C (Ghasemi et al., 2014). Como vehículo se empleó SSI o la secuencia al azar del péptido β A 42 (β A scr) (Millipore, California, U.S.A.). La administración de las soluciones se realizó de manera bilateral con jeringa y bomba Hamilton, a un volumen de 0.5 μL y a una velocidad de 0.25 $\mu\text{L}/\text{min}$. La concentración del péptido fue de 7 μM , en ambos hemisferios.

Durante los experimentos de determinación del efecto temporal de β A 42 sobre las fibras catecolaminérgicas las inyecciones intrahipocampales se realizaron a 24 h, 5 días y 8 días antes del sacrificio, mientras que durante los protocolos conductuales las inyecciones se realizaron 24 h antes de la memoria a largo plazo (Fig. 5).

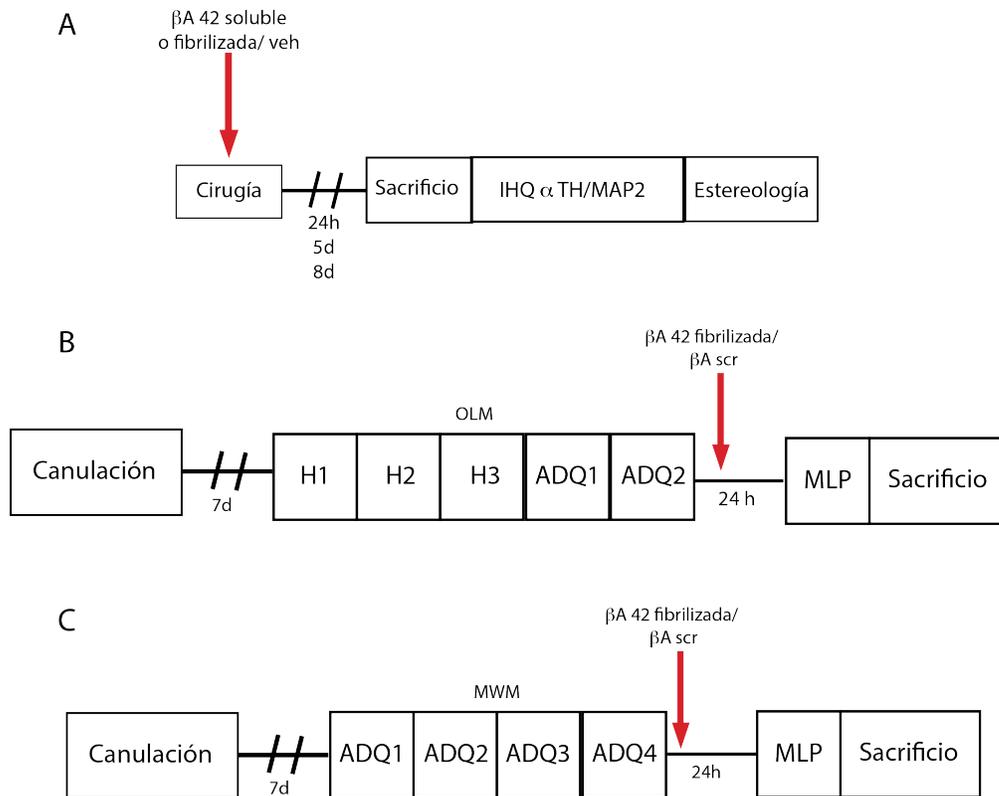


Fig.5 Protocolo experimental. En el cuadro se resume el protocolo de experimentos empleado para el desarrollo de esta tesis. A) Experimentos para la determinación del efecto de β A 42 sobre los axones catecolaminérgicos. B) Protocolo de evaluación del efecto de β A 42 sobre la evocación de la tarea de localización de objetos (OLM). C) Protocolo de evaluación del efecto de β A 42 sobre la evocación del laberinto acuático de Morris (MWM). Las flechas rojas señalan el momento de la administración intrahipocampal de la β A 42, β A scr o vehículo. H1-3 se refiere a las habituciones, mientras que ADQ1-4 se refiere a las adquisiciones de la tarea y MLP a la prueba de memoria de largo plazo.

6.4 Inmunohistoquímica contra TH y MAP2

Para confirmar el efecto de β A 42 sobre las fibras catecolaminérgicas y otras fibras presentes en CA1 del hipocampo se empleó la técnica de

inmunohistoquímica contra TH y contra la proteína asociada a microtúbulos 2 (MAP2).

Se empleó un protocolo de inmunohistoquímica que se llevó a cabo en 2 días. El primer día se realizaron 3 lavados con buffer Trizma 0.1 M y NaCl 0.9% pH 7.4 (TBS 1X) por 10 min cada uno. Después, se lavó 3 veces con buffer 0.1 M Trizma, NaCl 0.9% y tritón 0.1% pH 7.4 (TBST 0.1%) (cada lavado es de 10 min) y se incubó con solución de bloqueo (TBST 0.1% y BSA 3%) por 30 min. Los anticuerpos primarios usados fueron el anticuerpo rabbit anti-TH (1:1000 μ L, Pel-Freez, Arkansas, U.S.A) y el anticuerpo mouse anti-MAP2 (1:200 μ L, Millipore, Darmstadt, Alemania); ambos fueron incubados a 4°C por 24 h. El segundo día se lavó 6 veces con TBS 1X, (cada lavado por 10min), posteriormente se realizó una incubación de 1 h con los anticuerpos secundarios goat anti rabbit IgG Cy3 (1:400 μ L, Millipore, Darmstadt, Alemania) y el secundario goat anti Mouse IgG FITC (1:250 μ L, Millipore, Darmstadt, Alemania). Para finalizar, se agregó DAPI (300 nM, Waltham, Massachusetts, U.S.A.). El montaje se realizó en portaobjetos silanizados (VWR, Leuven, Bélgica) con medio de montaje Dako (Dako, U.S.A.).

6.5 Cuantificación de la longitud de axones positivos a TH o MAP2 mediante estereología

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

Para la cuantificación de las fibras de TH y MAP2 se empleó la prueba de *SpaceBalls* (sondas esféricas) del software Stereo Investigator®. Esta prueba estereológica permite estimar la longitud de las fibras que hay en un

determinado volumen a partir de un muestreo sistemático aleatorio realizado en secciones distribuidas de manera uniforme en los planos X, Y y Z a lo largo de la región de interés sin importar su forma u orientación en el espacio (MBF Bioscience, 2015).

El uso de esta prueba requiere de la selección del tamaño de la esfera o disector y de la malla de conteo. Cada esfera integra las áreas muestreadas en Z dentro de la malla de conteo que se tiene a lo largo de la región de interés (Fig. 6). Las secciones de tejido o cortes a muestrear deben estar separados entre si por una periodicidad determinada. Además, se mide el grosor de cada sección muestreada.

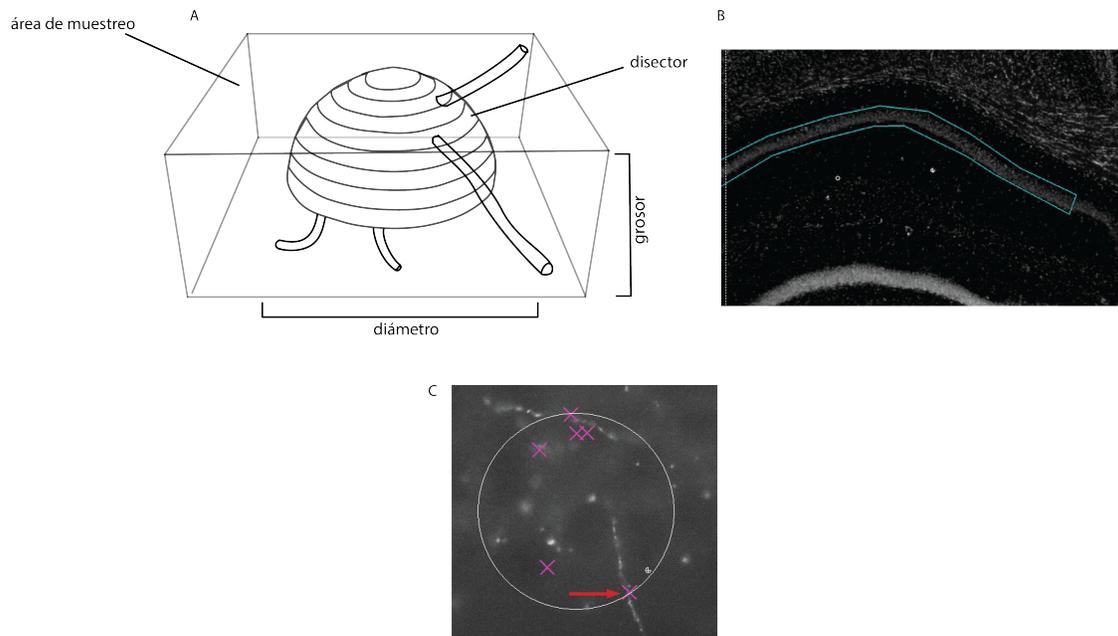


Fig 6. Cuantificación de la longitud de axones por estereología. A) En la imagen se ejemplifica como el disector o esfera cruza los axones en los diferentes planos (X,Y,Z) en las secciones de tejido (modificado de West, 2018) **B)** área de interés seleccionada sobre la que se tiene la malla de disectores o esferas. **C)** ejemplo de conteo de fibras que cruzan el disector o esfera a determinado plano Z.

En este trabajo se cuantificaron los axones positivos a TH y a MAP2 en CA1 del hipocampo (región AP -2.48 a -3.28 mm); (Atlas, 2009). El tamaño de la malla fue de 150x150 μ m, el número de cortes que se contó fue de 5, con una

periodicidad de 5 y el coeficiente de Gundersen en todos los casos fue menor a 0.12.

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

Únicamente se cuantificaron las fibras cuya señal positiva a TH y MAP2 tocaba los bordes de la esfera de conteo como se muestra en la Fig. 6C

Las fotografías representativas de cada estructura se tomaron en el microscopio confocal LSM800 (Zeiss, Oberkochen, Alemania) de la Unidad de Microscopia del IFC, el cual esta equipado con láseres LD y luz ultravioleta. Cada imagen con un área de 1024 x 1024 μm . Posteriormente se les procesó con el software Image J (NIH) para transformarlas en imágenes de 16- bits y darles color.

6.6 Memoria de Localización de Objetos .

i) Objetos y aparatos.

Se emplearon 4 objetos contruidos de bloques (Lego[®], México), 2 idénticos entre si denominados robot y 2 idénticos entre si denominados edificio. Los objetos se colocaron dentro de dos cajas de madera cuadradas de 33 cm x 30 cm; el piso de éstas se cubrió con aserrín durante el desempeño de la tarea. También se añadió una clave espacial de 4 x 28 cm que consistió de rayas verticales negras pintadas sobre fondo blanco (cada raya mide 1.5 cm de ancho). La clave espacial se colocó dentro de la caja en una pared a 2 cm del piso (Fig. 7)

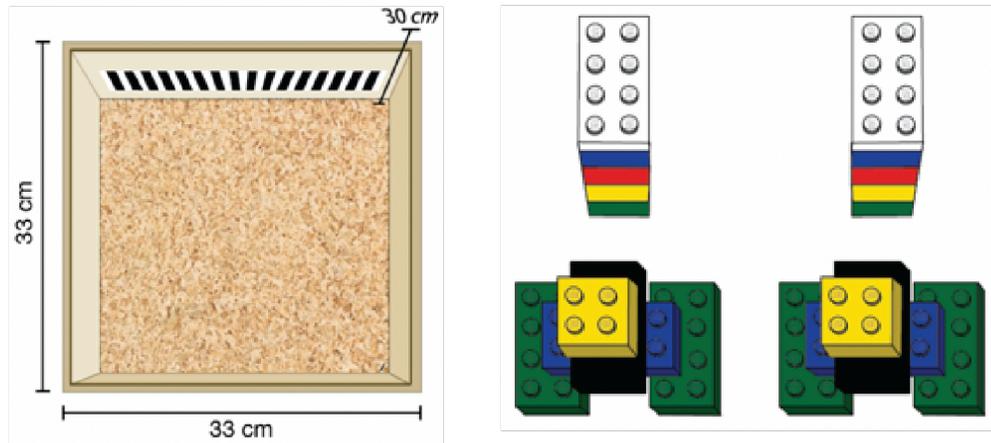


Fig 7. **Objetos y aparatos de la tarea de localización de objetos (OLM).** A la izquierda se muestra un esquema de la caja en la que se llevó a cabo la tarea. A la derecha se muestran los objetos empleados en dichas pruebas. Legos superiores edificios y legos inferiores robots (Violante Soria, 2014).

Con la finalidad de reducir sesgos debidos a preferencia por algún objeto, se balanceó la elección de éstos y sus ubicaciones. Es decir, que los cuatro objetos ocuparon todas las configuraciones posibles dentro de la arena en la que se llevó a cabo la tarea.

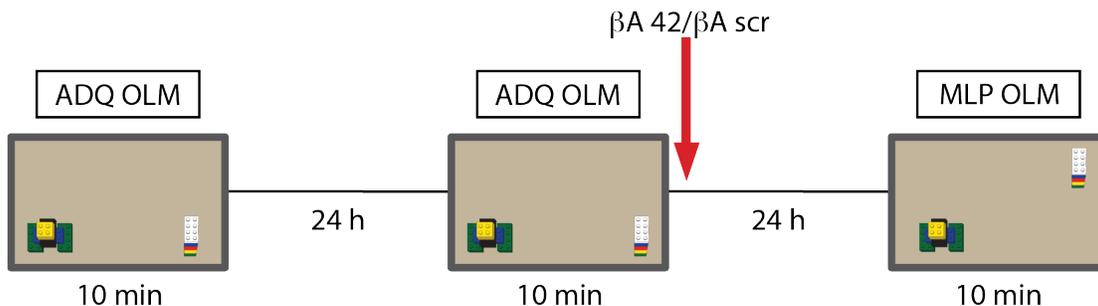


Fig 8. **Protocolo para la tarea de localización de objetos (OLM).** Durante la fase de habituación se permite a los sujetos explorar un contexto 3 días seguidos. El cuarto día se realiza la fase de adquisición de OLM (ADQ OLM) durante la cual se presentan dos objetos al ratón. Al siguiente día, en una segunda adquisición, se presentan los mismos objetos. Finalmente, se realiza la prueba de memoria de largo plazo, en la que uno de los objetos se desplaza a una ubicación novedosa. Cada día se permite a los sujetos explorar el contexto o los objetos por 10 minutos.

ii) Protocolo de localización de objetos.

El protocolo de OLM empleado consistió en 3 fases: la habituación, la

adquisición y la memoria a largo plazo o evocación. La primera consistió en 3 días durante los cuales se introdujo al sujeto a una de las cajas (contexto) durante 10 minutos; con el fin de que el contexto se volviera familiar. Durante la segunda fase, denominada adquisición, se introdujo en la caja un par de objetos diferentes que el sujeto nunca antes había visto (por ejemplo, robot y edificio). A cada sujeto se le dieron 10 minutos para explorar los objetos. En la última fase, denominada memoria a largo plazo, uno de los objetos se desplazó a una ubicación novedosa. Al igual que en las fases anteriores, a cada sujeto se le dieron 10 minutos para explorar los objetos. Entre cada acceso a la caja que tiene el sujeto pasan 24 horas (Fig. 8).

La adquisición y la prueba de memoria a largo plazo fueron videograbadas con cámaras digitales HD modelo c270 (Logitech, California, U.S.A) para su posterior análisis.

Para considerar que el roedor está explorando un objeto su cabeza debe estar orientada hacia los objetos y a una distancia menor a 2 cm. Si el sujeto muerde el objeto, no orienta su cabeza hacia este o sólo pasa a su alrededor no se considera que esté explorando el objeto (Violante Soria, 2014).

iii) Índice de reconocimiento

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

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

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

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

anterior como:

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

donde OF es el total de tiempo de exploración del objeto familiar en centésimas de segundo, ON es el total de tiempo de exploración del objeto con localización novedosa en centésimas de segundo y OF+ON es el tiempo total de exploración del OF más el tiempo total del tiempo de exploración del ON.

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

6.7 Laberinto acuático de Morris.

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

i) Aparatos

Se usó de una tina circular de 110 cm de diámetro y 64.4 cm de alto con una plataforma blanca de 13.2 x 13.2 cm. Se llenó la tina con agua a 20°C hasta que la plataforma quedó sumergida 1 cm y se agregó pintura blanca para que la plataforma no fuera visible. Al igual que en la tarea de OLM se colocaron claves visuales para que el ratón pudiera orientarse al estar dentro de la tina, estas claves consistieron en una cruz y un cuadrado dentro del laberinto y del experimentador sentado en el mismo punto durante todos los ensayos y la memoria a largo plazo.

ii) Protocolo del Laberinto acuático de Morris.

El protocolo de entrenamiento del MWM consta de 4 días de entrenamiento separados por 24 h cada uno y una prueba de memoria a largo plazo (24 h después de finalizado el cuarto día de entrenamiento).

Cada día de entrenamiento consta de 4 ensayos en los que se permite al sujeto nadar en la tina con agua y pintura blanca desde diferentes posiciones (1 a 4). La finalidad es que el sujeto encuentre la plataforma sumergida. Se mide el tiempo de latencia que tarda el sujeto en llegar desde cada posición a la plataforma; el tiempo no debe pasar de 60 s (Fig. 9).

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

Al igual que las prueba de OLM, la prueba fue videograbada con cámaras digitales HD modelo c270 (Logitech, California, U.S.A) para su posterior análisis.

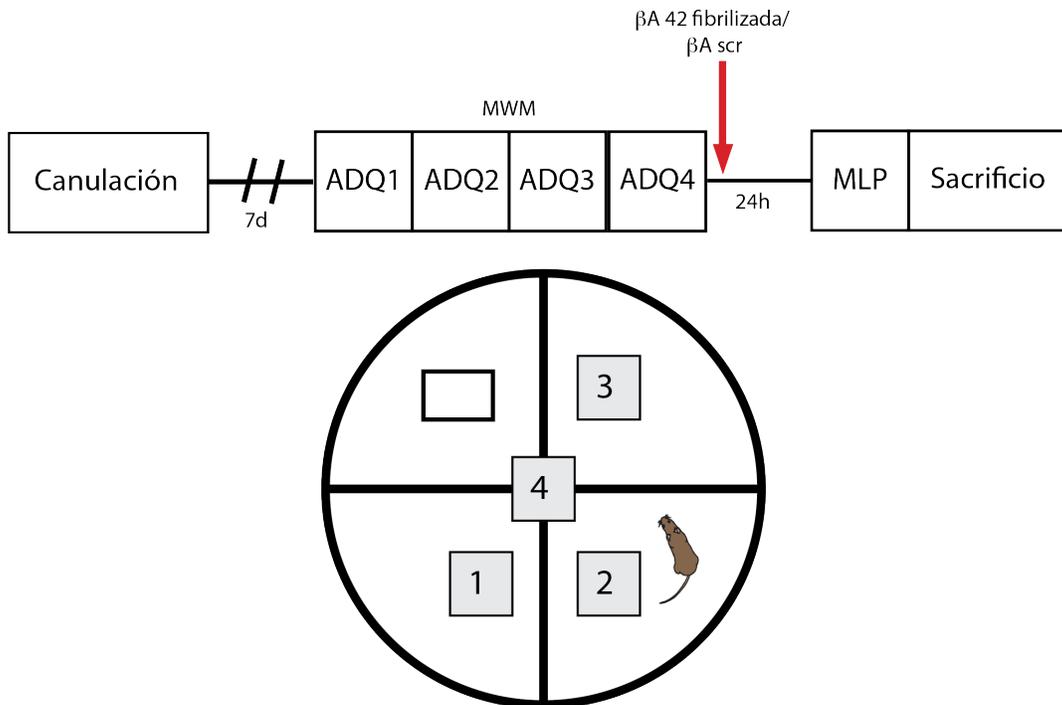


Fig 9. **Protocolo para Laberinto Acuático de Morris (MWM).** Se dan 4 días de entrenamiento en los que el ratón entra en diferentes posiciones al laberinto (señaladas por los números en cuadros), y desde las cuales debe aprender a localizar la plataforma. Una vez terminados los entrenamientos se dejan pasar 24 h y se lleva a cabo la prueba de memoria a largo plazo (MLP) y el sacrificio del roedor.

- iii) Análisis de la prueba de memoria a largo plazo del Laberinto acuático de Morris.

El análisis de los videos obtenidos del MWM se realizó a través del *plug in Animal tracker* del software Image J (NIH), en el que se calibraron los pixeles con respecto al tamaño de la tina en la que se realizó el MWM. En este caso cada 5 pixeles corresponden a aproximadamente 1 cm. El software permite cuantificar la latencia al primer cruce en el sitio donde estuvo situada la plataforma, el número de cruces por dicho sitio y el tiempo de permanencia en el cuadrante donde estuvo la plataforma o blanco. También se determinaron la velocidad media de nado y la distancia recorrida en 60 s.

6.8 Sacrificio.

En los experimentos para determinar el efecto temporal de la inyección de β A 42, el sacrificio se realizó a las 24 h, 5 días y 8 días tras la cirugía. En el caso de los experimentos conductuales, el sacrificio se realizó una hora después de la prueba de memoria de largo plazo.

En los animales que no se evaluó un protocolo conductual y a los que se les aplicó la prueba OLM, se empleó una sobredosis de pentobarbital sódico vía i.p. para el sacrificio. La perfusión se realizó de manera intracardiaca con SSI 0.9%, seguido de paraformaldehído (PFA) al 4% a pH 7.4. Tras esto, se extrajo el cerebro de los sujetos y se almacenó en PFA 4%, por 24 h. Para la etapa de criopreservación, los cerebros se almacenaron en sacarosa 30% a 4°C por 24 h. Se realizaron cortes coronales de 40 μ m de todo el cerebro y se recuperaron las rebanadas correspondientes al área de interés para su posterior proceso mediante inmunohistoquímica.

6.9 Análisis estadístico.

Para determinar el efecto de la longitud de axones positivos a TH y MAP2 a diferentes tiempos y determinar si existían diferencias significativas en las adquisiciones durante el MWM se emplearon pruebas de ANOVA de medidas repetidas de 2 vías con Fisher LSD como post hoc.

En el caso de la tarea de OLM se emplearon pruebas de t de Student de dos colas para evaluar si el índice de reconocimiento es diferente de 0.5 en las adquisiciones y prueba de memoria a largo plazo. Para determinar si había diferencias en el tiempo total de exploración de la tarea de OLM se empleó una t de Student independiente de dos colas.

Para el análisis de las diferentes variables evaluadas en la prueba de memoria a largo plazo de la tarea de MWM (incluidas la velocidad de nado y la distancia recorrida) se empleó una prueba de ANOVA de 1 vía, con Fisher LSD como post hoc. La misma prueba fue empleada para determinar si existían diferencias entre

la longitud de los axones positivos a TH tras las prueba de memoria de MWM.

Se consideró un valor de $p < 0.05$ como estadísticamente significativo. El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el programa GraphPad Prisma 6.0 (GraphPad Software). Todos los datos se presentan como la media \pm error estándar.

7. Resultados.

7.1 Efecto temporal de la administración de β A soluble y fibrilizada sobre las fibras catecolaminérgicas del hipocampo.

Con la finalidad de evaluar el impacto neurotóxico temporal de la administración de oligómeros de bajo peso molecular y fibrillas en el hipocampo dorsal, sobre los axones catecolaminérgicos del hipocampo, se administraron dos soluciones denominadas β A42 soluble y β A42 fibrilizada.

La cuantificación por estereología de la longitud de las fibras positivas a TH se realizó a las 24 horas (Fig.10B), 5 (Fig.10C) y 8 días (Fig.10D) de la administración de las diferentes soluciones de β A42. Para determinar si esta administración induce un efecto estadísticamente significativo se llevó a cabo un análisis de varianza de dos vías y una prueba de Fisher's LSD como post hoc. Este análisis mostró que el tratamiento tiene un efecto estadísticamente significativo sobre la longitud de las fibras positivas a TH ($F_{2,21}=10.58$, $P=0.0007$) y que ambas soluciones (β A42 soluble y β A42 fibrilizada) disminuyen la longitud de estas fibras de manera significativa respecto al vehículo tanto a las 24 horas como a los 5 días; sin embargo esta diferencia se pierde a los 8 días.

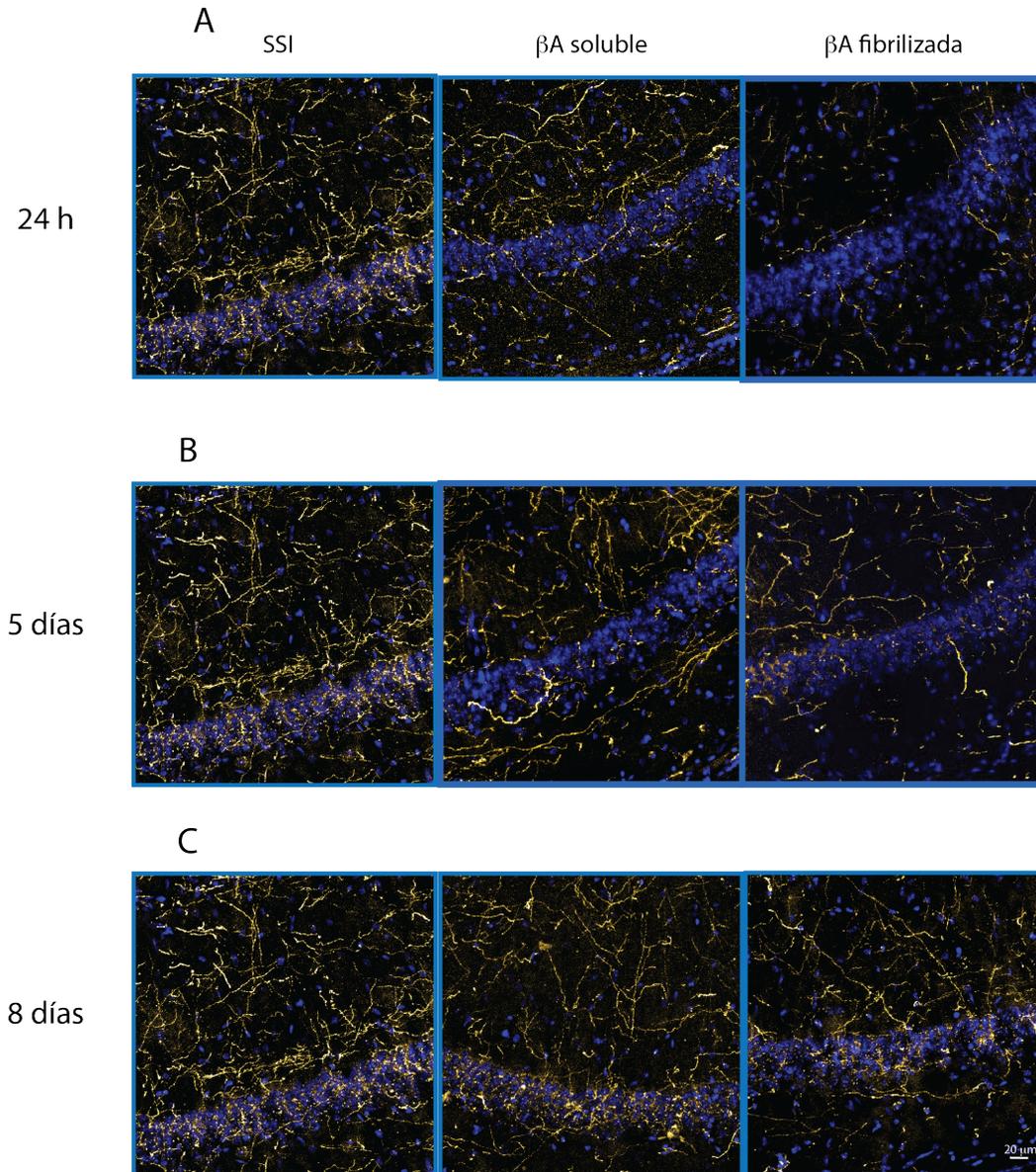


Fig11. Efecto de la administración de β A42 soluble y fibrilizada sobre las fibras catecolaminérgicas a diferentes tiempos. A) Imágenes representativas de las terminales catecolaminérgicas en CA1, 24 horas tras la administración de los diferentes tratamientos (SSI, β A42 soluble y β A42 fibrilizada). B) imágenes representativas de las terminales catecolaminérgicas en CA1, 5 días después de la administración de los diferentes tratamientos. C) imágenes representativas de las terminales catecolaminérgicas en CA1, 8 días después de la administración de los diferentes tratamientos.

Para poder evaluar el impacto de la administración de una solución de β A42 soluble o fibrilizada sobre otro tipo de fibras que no fueran las terminales

catecolaminérgicas del hipocampo se decidió evaluar la longitud de las fibras de MAP2 en CA1 a las 24 horas (Fig.11A), 5 (Fig.11B) y 8 días (Fig.11C).

No se encontró disminución significativa de la longitud de fibras positivas a MAP2 a ninguno de los tiempos evaluados (Fig. 12)(F_{2,8}= 1.351, P=0.3123). Todo esto acorde a una ANOVA de 2 vías con Fisher LSD como post hoc.

Debido a que el mayor efecto de disminución de fibras catecolaminérgicas se observó 24 h después de la administración de βA fibrilizada, se decidió administrar ésta solución para evaluar los efectos en la evocación de las tareas de OLM y MWM.

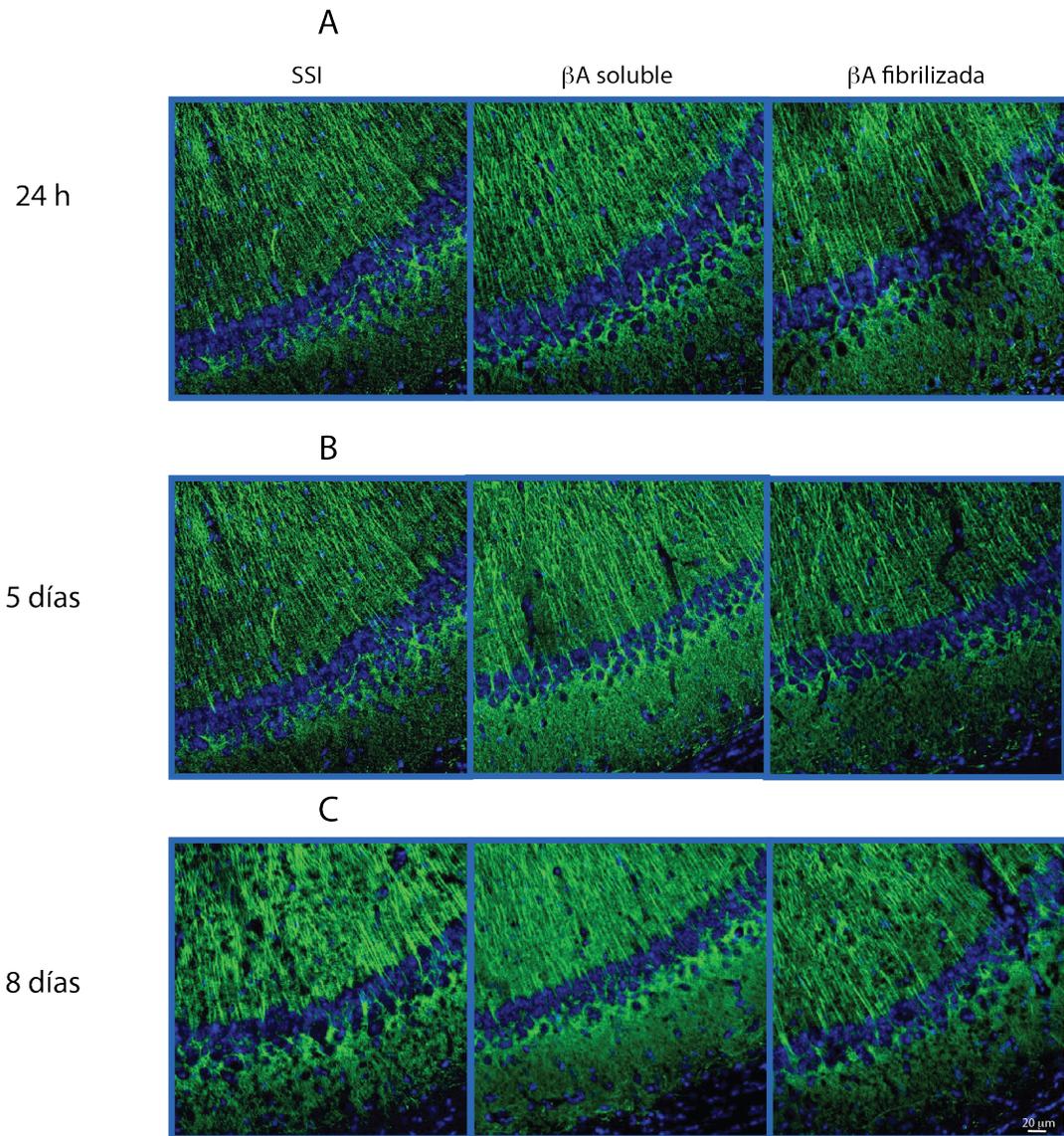


Fig 11. Efecto de la administración de β A42 soluble y fibrilizada sobre las fibras positivas a MAP2 a diferentes tiempos. A) imágenes representativas de las terminales positivas a MAP2 en CA1 tras la administración de los diferentes tratamientos (SSI, β A42 soluble y β A 42 fibrilizada) 24h. B) imágenes representativas de las terminales positivas a MAP2 en CA1 después de la administración de los diferentes tratamientos con β A42 a 5 días. C) imágenes representativas de las terminales positivas a MAP2 en CA1 después de la administración de los diferentes tratamientos con β A42 a 8 días.

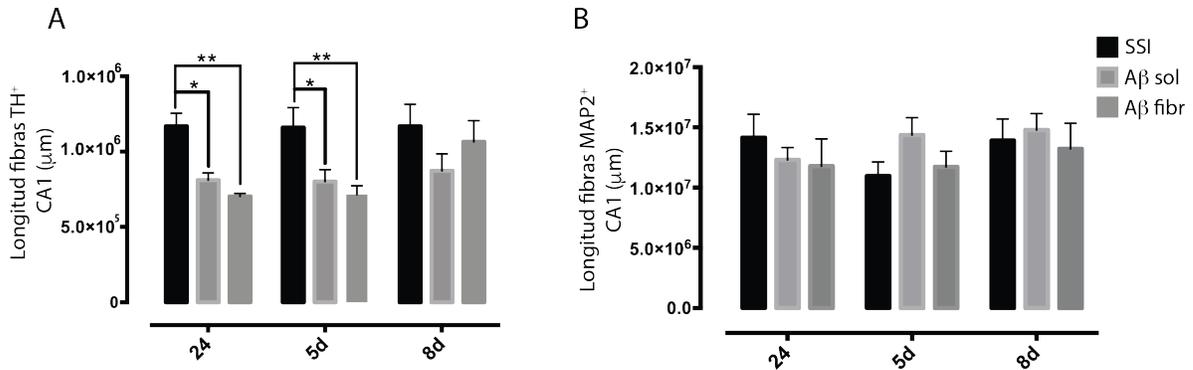


Fig12. Cuantificaciones del efecto de la administración de β A42 soluble y fibrilizada sobre las fibras positivas a TH y MAP2 a diferentes tiempos. A) cuantificación de la longitud de las fibras positivas a TH y MAP2 en CA1 después de la administración de los diferentes tratamientos con β A42 soluble y fibrilizada a diferentes tiempos (24 h, 5 y 8 días). * $p < 0.05$. ** $p < 0.01$.

7.2 Efecto de la administración de β A sobre la evocación de una tarea de OLM.

El sistema catecolaminérgico juega un papel importante en la codificación de la novedad contextual por lo que se decidió evaluar el efecto de la administración de β A fibrilizada y β A scr en la evocación de la tarea de OLM de animales.

Durante las adquisiciones de la tarea de OLM, previas a la administración de β A scr o fibrilizada, ambos objetos son identificados con una localización familiar acorde a una *t* de Student independiente) tanto en la primera adquisición ($t_6=0.3207$, $p= 0.7593$, β A scr) ($t_9=0.6708$, $p= 0.5192$, β A 42) como en la segunda ($t_6=0.2595$, $p= 0.8039$, β A scr) ($t_9=0.6940$, $p= 0.5052$, β A 42) (Fig.13B y C). Sin embargo, en la prueba de memoria a largo plazo 24 h después de la administración de ambos péptidos, únicamente los sujetos a los que se les administró β A scr fueron capaces de identificar la localización novedosa como señala la prueba de *t* de Student independiente ($t_6=6.148$, $p=0.008$); no fue así en el caso de los ratones administrados con β A fibrilizada ($t_9= 1.446$, $p= 1.822$) (Fig. 14 B).

Los tiempos de exploración total de ambos grupos no fueron estadísticamente

diferentes durante las adquisiciones 1 ($t_{15}=0.7217$, $p=0.4816$) y 2 ($t_{15}=0.4915$, $p=0.6302$) (Fig.13D y E) y memoria a largo plazo ($t_{15}=0.8772$, $p=0.3933$) de la tarea de ORM acorde a una prueba t de Student independiente (Fig. 14 C).

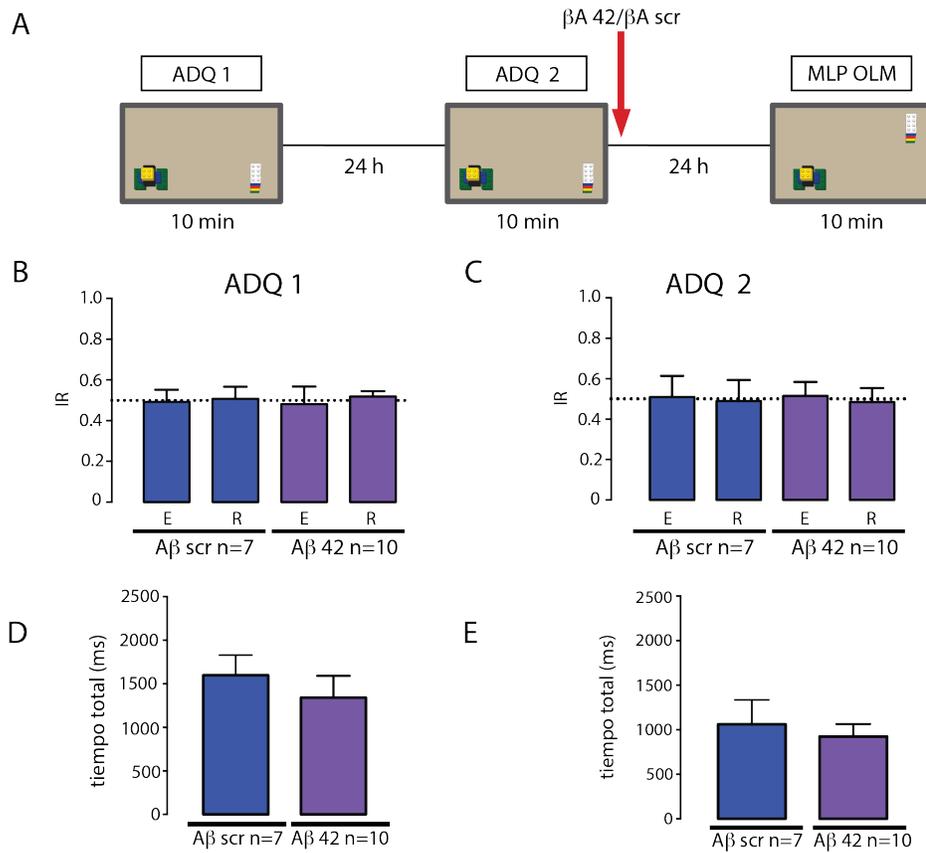


Fig.13. Adquisición 1 Y 2 (ADQ1/ADQ2) de la tarea de OLM (Object Location Memory). **A)** Diagrama del protocolo de OLM. **B)** ADQ1 de OLM. Se muestra el índice de reconocimiento (IR) de los objetos E y R para el grupo $\beta A scr$ (n=7) y el grupo $A\beta$ fibrilizada (n=10). **C)** ADQ2 de OLM. Se muestra el IR de los objetos E y R para el grupo $\beta A scr$ (n=) y el grupo $A\beta$ fibrilizada (n=). **D)** tiempo total de exploración de ADQ1. **E)** tiempo total de exploración de ADQ 2.

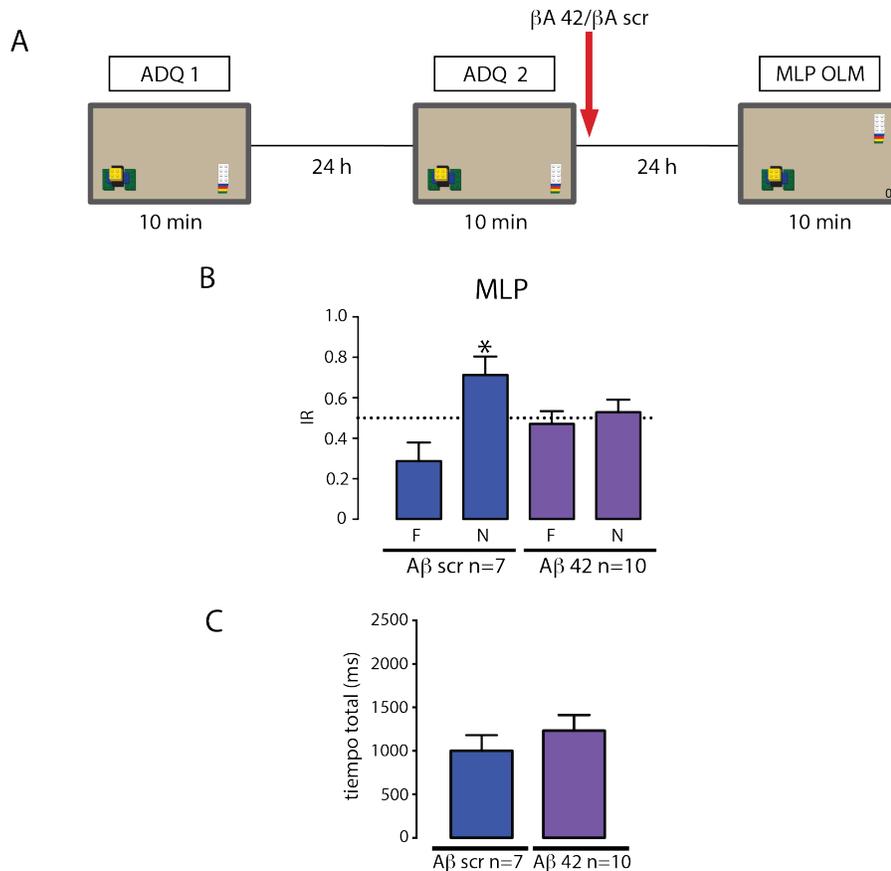


Fig 14. Prueba de memoria a largo plazo (MLP) de la tarea de OLM (Object Location Memory). **A)** Diagrama del protocolo de OLM. **B)** Prueba de MLP 24 h después de la ADQ2 y la inyección Aβ scr o βA fibrilizada. Se muestra el índice de reconocimiento (IR) de los objetos con localización familiar (OLF) y localización novedosa (OLN) para el grupo βA scr (n=7) y el Aβ fibrilizada (n=10). **C)** tiempo total de exploración de MLP. * p<0.05.

7.3 Efecto de la administración de βA sobre la evocación de una tarea de memoria espacial.

Con el fin de evaluar el efecto de la administración de βA42 fibrilizada sobre la memoria a largo plazo de una tarea de memoria espacial se realizó un protocolo de MWM. Durante las adquisiciones de la tarea (previas a la inyección del péptido), se observa claramente que todos los sujetos tanto, intactos como canulados, tienen un buen desempeño, tendiendo a disminuir su latencia de llegada a la plataforma cada día (Fig.15B).

Una hora después de la última adquisición, los ratones canulados fueron divididos en dos grupos: β A scr y β A42 fibrilizada para la administración intrahipocampal con dichos péptidos. La prueba de memoria a largo plazo se realizó a las 24 horas después. Los ratones a los que se les administro β A42 fibrilizada tienen una mayor latencia que los ratones intactos o los administrados con β A scr. Esto acorde a un análisis de ANOVA de 1 vía con Fisher como post hoc ($P=0.4317$, $F_{2,28}= 0.8658$) (Fig. 15C).

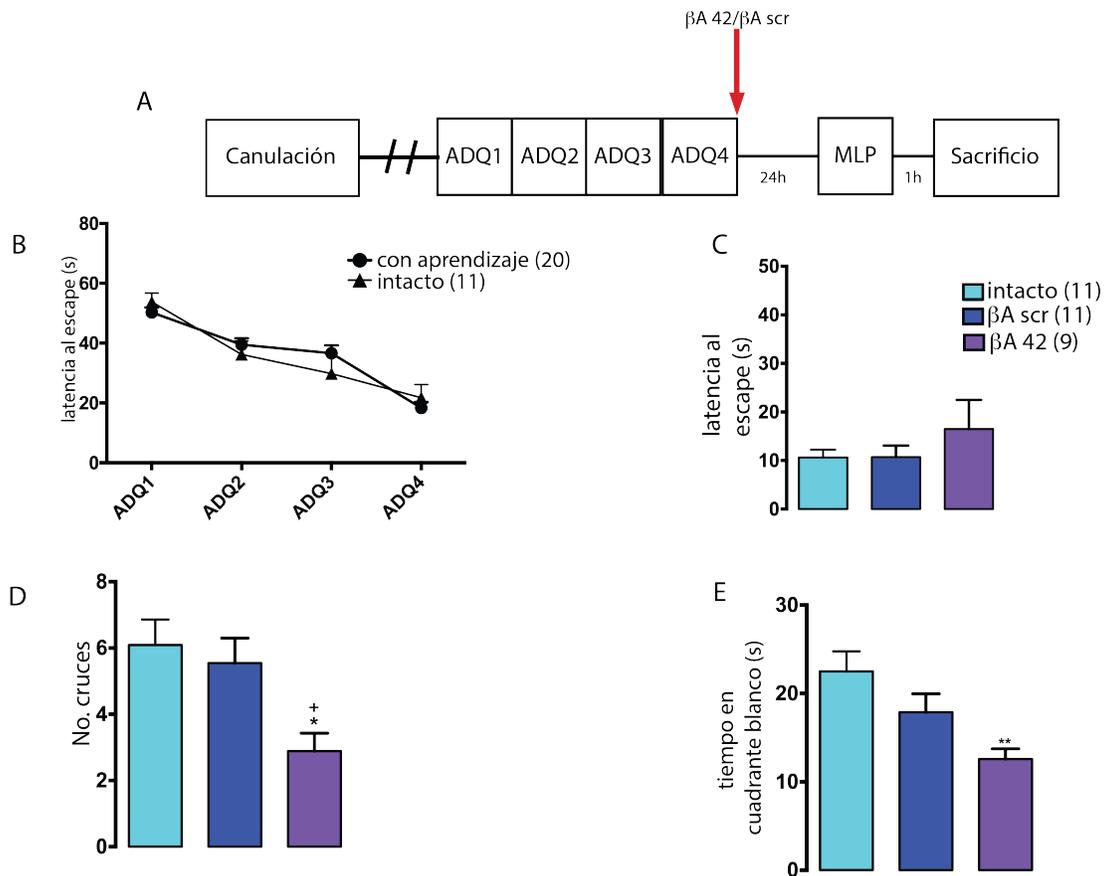


Fig 15. Prueba de laberinto acuático de Morris (MWM) en ratones administrados con β A42 fibrilizada al termino de las adquisiciones. A) Protocolo empleado para evaluar el efecto de β A42 en la evocación del MWM. B) Curva de aprendizaje de la adquisición del MWM. C) Latencia al escape de la memoria a largo plazo. D) Número de cruces en la prueba de memoria de largo plazo. E) Tiempo que pasan los ratones en el cuadrante blanco (en el que estuvo la plataforma). Los * representan diferencias contra el intacto, + representa diferencias contra β A scr. * o + $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$.

Además el número de cruces por el lugar donde se encontraba la plataforma

durante los ensayos también se ve afectado por la administración intrahipocampal de β A42 fibrilizada como lo determina una prueba de ANOVA de 1 vía y post hoc Fisher LSD ($P=0.0110$ $F_{2,28}=5.320$) (Fig.15D). También se midió el tiempo que todos los grupos de animales pasaron en el cuadrante blanco (donde estuvo la plataforma durante la adquisición). Acorde a los análisis estadísticos los ratones intactos y β A scr pasan más tiempo en el cuadrante blanco que los ratones que fueron administrados con β A42 fibrilizada ($P=0.0067$, $F_{2,28}=6.014$) (Fig.15E).

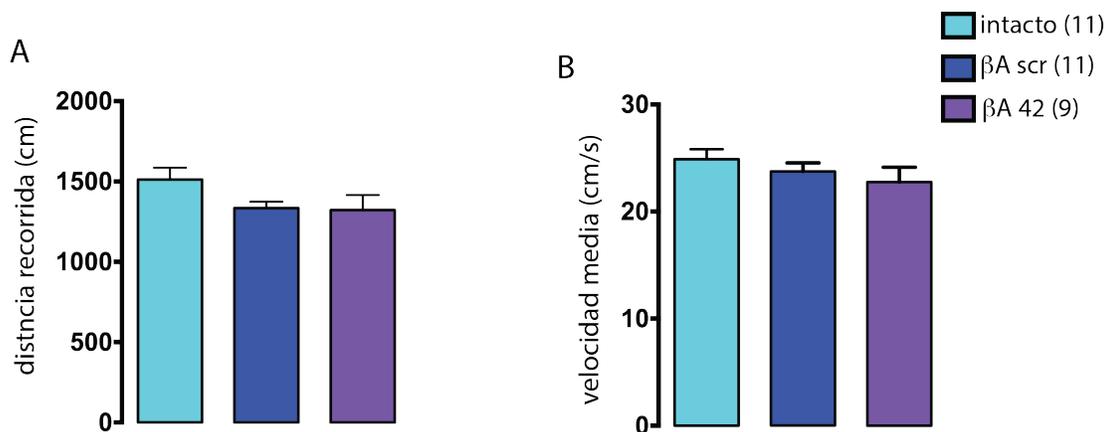


Fig.16. Distancia recorrida y velocidad media de la prueba de laberinto acuático de Morris (MWM) en ratones administrados con β A42 fibrilizada al termino de las adquisiciones. A) Distancia recorrida en cm. B) Velocidad de nado media en cm/s.

Durante la prueba de memoria se midió la distancia recorrida ($P=0.1102$, $F_{2,28}=2.389$) (Fig.16A) y la velocidad promedio de nado ($P=0.3600$, $F_{2,28}=1.060$) (Fig.16B) de todos los animales; esto para descartar que el número de cruces se viera disminuido debido a algún problema motor.

7.4 Efecto de la administración de β A sobre las fibras catecolaminérgicas del hipocampo previo a la evocación de la tarea de MWM

También se evaluó el impacto de β A fibrilizada sobre las terminales catecolaminérgicas del hipocampo tras la prueba de memoria de largo plazo de la tarea de MWM (Fig17). No se encontró disminución significativa de los axones entre los grupos intacto y β A scr, sin embargo, si existe una diferencia significativa entre los grupos intacto y β A scr respecto al grupo administrado con β A fibrilizada antes de la evocación.

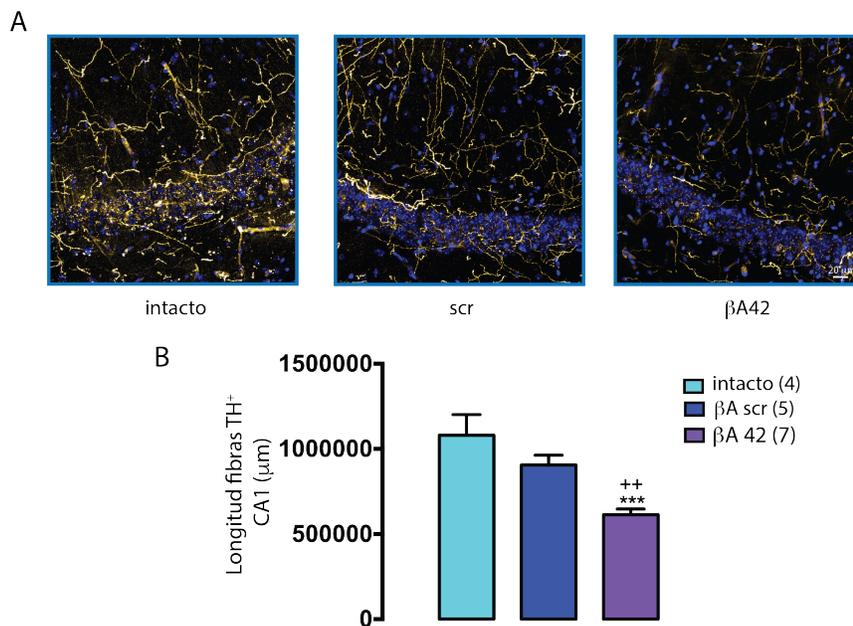


Fig.17. Fotografías y cuantificación del efecto de la administración de β A42 fibrilizada sobre las fibras positivas a TH. A) Fotografías representativas de las fibras catecolaminérgicas en diferentes condiciones evaluadas; intacto, scramble (β A scr) y Beta amiloide (β A42). B) Cuantificación de la longitud de las fibras positivas a en CA1 en las diferentes condiciones después de la memoria a largo plazo del MWM. * indica diferencias entre intacto y β A 42. + indica diferencias entre β A scr y β A 42. *** $p < 0.001$. ++ $p < 0.01$.

8. Discusión.

8.1 Efecto temporal de la administración de β A soluble y fibrilizada sobre las fibras catecolaminérgicas del hipocampo.

En los últimos años la cantidad de reportes que señalan al exceso del β A como el responsable del deterioro cognitivo y pérdida de memoria vinculados a la EA han aumentado. Diferentes evidencias experimentales señalan que el circuito que va del VTA al hipocampo se ve afectado desde etapas tempranas de la EA; esto es importante dado que se propone que este circuito neuronal juega un papel importante en la codificación de información novedosa y el establecimiento de trazos de memoria a largo plazo (Cordella et al., 2018; Nobili et al., 2017).

Como se mencionó en la introducción la mayoría de los daños implicados en la sinapsis mediados por β A comienzan antes de la acumulación del péptido en placas, por lo que muchos grupos de investigación han recurrido no solo estudiar a los modelos transgénicos para la EA, sino también a modelos de toxicidad de β A (Sharma et al., 2016; Zussy et al., 2011b). La administración de β A, ya sea en el parénquima o de forma interventricular, es uno de los modelos que permiten estudiar de forma aguda el daño que el péptido amiloide tiene sobre diferentes sistemas de neurotransmisión y sobre la memoria. Este modelo tiene la ventaja de que otros factores como la Tau hiperfosforilada no están implicados por lo que se puede determinar si los efectos negativos se deben a la toxicidad del β A o no.

En los experimentos realizados durante el desarrollo de esta tesis encontramos que la administración intrahipocampal de β A42 disminuye de manera significativa las fibras catecolaminérgicas tras 24 h de administración, esto concuerda con la literatura, ya que se ha reportado que tanto inyecciones de oligómeros de β A como modelos transgénicos de la EA que acumulan β A presentan pérdida de inmunoreactividad a TH en la corteza insular (Guzmán-

Ramos et al., 2012; Moreno-Castilla et al., 2016) y el hipocampo (Cordella et al., 2018; Liu et al., 2008; Nobili et al., 2017). A pesar del evidente efecto negativo que tiene el β A sobre las terminales catecolaminérgicas, no hay estudios que evalúen como se encuentran la integridad de estas fibras días después de la administración aguda del péptido β A 42. Por lo que en este trabajo decidimos realizar una curva temporal de 3 tiempos para evaluar si los efectos neurotóxicos de β A se mantenían después de 24 horas. Los tiempos evaluados fueron 24 h, 5 y 8 días, observándose una disminución significativa a las 24h, que se mantiene por 5 días pero no a los 8 días.

Debido a que algunos reportes señalan que la administración del péptido pre incubado *in vitro* para generar fibrillas genera déficits cognitivos más pronunciados que la administración del β A soluble (Delobette et al., 1997; Zussy et al., 2011b), decidimos probar si una solución de fibrillas de β A tendrían un mayor impacto sobre las terminales catecolaminérgicas del hipocampo. Como se puede observar en la Fig.12A, la longitud de las fibras catecolaminérgicas es menor cuando se administra una solución del β A 42 fibrilizada respecto a la soluble. A pesar de no haber encontrado diferencias entre el β A soluble y fibrilizado a ninguno de los tiempos evaluados, decidimos que el resto de los experimentos se realizaran con la solución de β A 42 fibrilizada, por ser la que mostraba mayor efecto tóxico sobre los axones catecolaminérgicos.

De sumo interés es la recuperación observada de las fibras catecolaminérgicas a los 8 días de haber sido inyectado el péptido β A 42 fibrilizado. Hasta ahora no existen otros reportes que hayan evaluado la toxicidad de la administración intrahipocampal de β A 42 sobre las fibras catecolaminérgicas después de 24 h. En modelos transgénicos de la EA la presencia de oligómeros de β A en el hipocampo resulta en la pérdida de terminales catecolaminérgicas y se asocia con la degeneración de somas del VTA (Liu et al., 2008; Nobili et al., 2017). Sin embargo, estos animales producen continuamente el péptido desde que son muy jóvenes pues tienen insertas mutaciones para la sobreproducción y

agregación del β A, lo que mantiene el efecto tóxico y de disminución de la longitud de las fibras por largos periodos de tiempo. Al respecto, en modelos de administración exógena de oligómeros de β A se ha reportado que la incorporación de un marcador retrógrado a las fibras expuestas al β A se ve afectado a las 24 h de la administración (Moreno-Castilla et al., 2016).

La morfología de las fibras tras la administración intrahipocampal con β A 42 es diferente a la de las fibras tras la administración de el vehículo, de manera que la longitud de las fibras es una de la variables que más se ve afectada, esto de acuerdo con reportes en pacientes con EA donde se señala que además de la disminución en frecuencia de las terminales inmunoreactivas a TH, también se aprecian axones más cortos y con signos de distrofia (Booze et al., 1993).

Para poder discernir si los axones catecolaminérgicos se veían mas afectados que otros por la administración del β A intrahipocampal, decidimos cuantificar las fibras positivas a MAP2. Esta proteína participa en el ensamblaje de microtúbulos en las neuronas, por lo que es un buen marcador no específico de filamentos o axones. Nuestros resultados de cuantificación por estereología señalan que no hay diferencias entre la cantidad de fibras positivas a MAP2 tras la administración de β A soluble o fibrilizada a ninguno de los tiempos medidos. Estos resultados sugieren que los axones catecolaminérgicos son especialmente sensibles al efecto tóxico de β A.

8.2 Efecto de la administración de β A sobre la evocación de una tarea de OLM.

Como se mencionó en la introducción, el empleo de tareas de memoria de reconocimiento es importante para la evaluación de déficits cognitivos o de memoria en modelos animales debido a que implican el uso de estructuras del lóbulo temporal medial; las cuales se ven severamente afectadas en demencias como la EA (Vogel-Ciernia et al., 2014).

La memoria de reconocimiento tiene dos componentes esenciales; el juicio de la

familiaridad/ novedad y el componente contextual. Hay evidencias de que estos componentes son procesados de manera diferencial entre las diferentes estructuras del lóbulo temporal medial, siendo el juicio de la familiaridad/novedad procesado mayormente por las cortezas perirrinal e insular y el componente contextual por el hipocampo (Balderas et al., 2008). Generalmente en el caso de el reconocimiento de objetos per se, se emplea la tarea de ORM y cuando hay cambios contextuales/espaciales la tarea de OLM. Debido a que la administración de fibrillas de β A 42 se realizó en el hipocampo decidimos emplear la tarea de OLM.

El hipocampo es una estructura clave en la formación de memorias y es de las primeras áreas que se ven afectadas por la patología de la EA. Este daño se ha propuesto como la principal causa en la pérdida de memoria episódica (Nobili et al., 2017). Por otro lado, se ha descrito que tanto la DA como la NE son importantes durante la evocación de una tarea que evalúa el componente contextual de la memoria de reconocimiento en el hipocampo (Moreno-Castilla et al., 2017). Por lo que decidimos evaluar si la administración intrahipocampal de β A fibrilizada, al generar la pérdida de terminales catecolaminérgicas, podía tener implicaciones en el correcto desempeño de una tarea de OLM.

Nuestros resultados arrojan que los ratones que fueron administrados con β A 42 fibrilizada 24 h antes de la evocación, y una hora después de la adquisición, no son capaces de detectar un cambio conformacional en una configuración contextual familiar (Fig.14B). Lo que se asemeja a los resultados obtenidos por Moreno-Castilla en 2017, en cuyo trabajo la administración de, 6-hidroxidopamina, una neurotoxina selectiva a las terminales catecolaminérgicas, impide la codificación de nueva información contextual. A la luz de estas evidencias relacionamos los déficits en la memoria observados en los ratones administrados con el péptido fibrilizado con la pérdida de terminales catecolaminérgicas del hipocampo, lo cual lleva a una deficiente liberación de DA y NE al momento de la evocación de una tarea que apela al componente contextual de la memoria de reconocimiento; a su vez esto se relaciona con

alteraciones en la plasticidad sináptica asociadas a un pobre aprendizaje o pérdida de memoria (Moreno-Castilla et al., 2016; Nobili et al., 2017).

8.3 Efecto de la administración de β A sobre la evocación de una tarea de memoria espacial.

Existen múltiples reportes que señalan que la integridad del hipocampo es necesaria para el desempeño de tareas de memoria espacial. Algunos estudios señalan que lesiones en esta estructura del lóbulo temporal suelen resultar en un aprendizaje pobre o en un mal desempeño en tareas de memoria como el MWM (von Bohlen und Halbach et al., 2006; Cho et al., 1998; Morris et al., 1982). En cuanto a la importancia de la integridad del sistema catecolaminérgico se ha reportado que la liberación de DA en el hipocampo es crucial para la atención requerida durante tareas de memoria espacial (Kempadoo et al., 2016). Además, algunos estudios en ratones transgénicos para la EA con un mal desempeño en la tareas espaciales, mejoran su desempeño tras ser tratados con un precursor de DA (Ambrée et al., 2009) o agonistas dopaminérgicos (Himeno et al., 2011). Esto señala la importancia de la correcta liberación de catecolaminas durante el aprendizaje de tareas espaciales.

Por otro lado, algunos estudios señalan que la administración intraventricular de β A 42 y β A₂₅₋₃₂ que ha sido incubada *in vitro* y forma agregados tipo fibrillas genera déficits cognitivos mas pronunciados que la administración del péptido soluble, tanto en la adquisición como en la memoria a largo plazo de la tarea de MWM. Con base en esto, decidimos administrar β A fibrilizado de forma intrahipocampal tras la ultima adquisición del MWM. Aunque los últimos reportes señalan que la actividad de los receptores D1/D5 promueve el aprendizaje de tareas espaciales, decidimos evaluar el efecto del β A sobre la evocación debido a que nuestros datos que señalan que las catecolaminas son necesarias para la codificación de la novedad contextual; y la remoción de la plataforma durante la memoria a largo plazo en el MWM califica como un cambio en el contexto.

Nuestros resultados muestran que una sola inyección de β A 42 fibrilizado tras la

cuarta adquisición afecta la memoria a largo plazo. Como se aprecia en la Fig.15C todos los grupos tienen una tendencia a disminuir su latencia a la plataforma a lo largo de los 4 días de entrenamiento; todo esto previo a las administraciones de β A scr o fibrilizado. Sin embargo, al terminar las adquisiciones y ser administrados con la solución del péptido fibrilizado, los ratones no fueron capaces de evocar la localización de la plataforma de forma correcta. En la Fig.15D se muestra claramente como los ratones intactos y los animales administrados con el β A scr poseen un mayor número de cruces y una latencia menor que los ratones administrados con el β A 42 fibrilizado. Dado que los animales no fueron administrados con el β A 42 fibrilizado sino hasta una hora después de la última adquisición, consideramos que el proceso de consolidación no se está viendo afectado y por lo tanto las diferencias en el desempeño durante la prueba de memoria a largo plazo sugieren un impedimento en la evocación de la memoria asociado al daño que el β A 42 induce sobre a las terminales catecolaminérgicas del hipocampo.

8.4 Efecto de la administración de β A sobre las fibras catecolaminérgicas del hipocampo previo a la evocación de la tarea de MWM

En este trabajo se decidió evaluar el impacto de la administración de β A 42 fibrilizado en el hipocampo tras la cuarta adquisición. Como se muestra en la Fig.17, la longitud de los axones catecolaminérgicos se ve disminuida tras la administración del β A fibrilizado, esto coincide con el mal desempeño en la prueba de memoria de largo plazo de la tarea de MWM. La disminución es bastante similar a la encontrada tras 24h de administración de β A 42 fibrilizada (Fig.12A) en animales sin protocolo conductual. Como se puede observar, la administración de β A scr parece tener un efecto sobre la longitud de las fibras TH+, sin embargo, la disminución en la inmunoreactividad de estos axones no es diferente a la de un sujeto administrado con SSI o intacto. Hasta ahora se reporta que β A scr tiende a formar agregados tipo fibrilla pero su efecto citotóxico es menor (Vadukul et al., 2017).

Entre los trabajos que han evaluado la susceptibilidad de diferentes tipos de axones a la acumulación de β A se menciona que las fibras catecolaminérgicas probablemente son más susceptibles a la toxicidad de β A debido a su longitud; las fibras positivas a TH sufren más daño en comparación con los axones colinérgicos que suelen ser axones más cortos, lo que podría sugerir que parte del mecanismo tóxico es generar fallas en el transporte retrógrado.

Finalmente, aunque nuestros experimentos señalan que parte de los efectos de daño cognitivo y pérdida de memoria en la EA son mediados por la toxicidad del β A sobre el sistema catecolaminérgico, aún queda por esclarecer el mecanismo mediante el cual la acumulación del β A genera la pérdida de axones positivos a TH. Aunque se ha establecido una clara correlación entre la disfunción del sistema catecolaminérgico debido a la acumulación de β A en modelos de la EA, aun no se tiene claro porque hay áreas del cerebro más susceptibles a la patología que otras. Por ejemplo, algunos reportes muestran que la pérdida de somas en modelos transgénicos de la EA se da únicamente en el VTA y no en otros núcleos catecolaminérgicos como el locus coeruleus (LC) y la sustancia nigra (Nobili et al., 2017); mientras que otros reportes indican que hay pérdida de somas catecolaminérgicos tanto en el LC como en el VTA, pero no en la sustancia nigra (Liu et al., 2008). La degeneración de los somas del VTA y el LC son eventos tardíos en la patología desarrollada por los modelos transgénicos de la EA. Esto es debido a que degeneración de las neuronas catecolaminérgicas comienza en los axones presentes en las áreas a las que proyectan estos núcleos y coincide con la presencia de oligómeros de β A (Liu et al., 2008; Nobili et al., 2017).

Aunque hasta ahora no hay una explicación de porque las neuronas de la sustancia nigra son resistentes a la patología de la EA, es de especial interés el hecho de que las áreas del cerebro a las que proyecta este núcleo no muestran las marcas histopatológicas clásicas de la EA. Respecto a esto, se ha reportado que las catecolaminas pueden inhibir la agregación del β A (Huong et al., 2010; Ono et al., 2013) y disgregarla (Li et al., 2004), por lo que tal vez al ser el

estriado una zona rica en DA se encuentre protegido de la patología amiloide.

Con estas evidencias del impacto negativo que tiene el β A sobre el sistema catecolaminérgico, la plasticidad cerebral y el desempeño cognitivo es de vital importancia continuar con los estudios de toxicidad del β A. Nuestros datos señalan que puede existir una ventana terapéutica de recuperación del sistema catecolaminérgico. Esto a su vez se suma a los diferentes reportes de mejora cognitiva en pacientes y modelos de la EA tras recibir tratamientos basados en mejorar la neurotransmisión catecolaminérgica.

9. Conclusiones

De los experimentos realizados en este trabajo se puede concluir que la administración intrahipocampal aguda del β A42 fibrilizado tiene un efecto negativo mayor sobre la longitud de los axones catecolaminérgicos en la región de CA1 del hipocampo al de la administración de β A42 soluble. Esto a su vez afecta la evocación de tareas de memoria de reconocimiento.

10. Perspectivas

Los resultados de la administración temporal de diferentes soluciones de β A 42 señalan la pérdida de la longitud a TH en los axones catecolaminérgicos desde las 24 h hasta los 5 días de administración del β A. Sin embargo, días después, alrededor de los 8 días, la longitud de las fibras se recupera, porque sería interesante definir si el fenómeno observado se debe a la retracción parcial del axón catecolaminérgico o más bien es producto de la pérdida de inmunoreactividad a TH. Debido a que esto último implicaría que el axón está intacto y que el daño realizado por la toxicidad del péptido β A es reversible en algún punto, sería interesante realizar experimentos que nos permitieran determinar la integridad de los axones catecolaminérgicos a los 8 días. Además, sería interesante explorar la integridad de la maquinaria de sinapsis de los

axones catecolaminérgicos y de los axones de otros sistemas de neurotransmisión para determinar si la susceptibilidad del sistema catecolaminérgico es mayor o igual a la de los otros sistemas.

11. Literatura citada

Ambrée, O., Richter, H., Sachser, N., Lewejohann, L., Dere, E., de Souza Silva, M. A., Herring, A., et al. (2009). Levodopa ameliorates learning and memory deficits in a murine model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 30, 1192–1204.

Armstrong, R. A. (2014). A critical analysis of the 'amyloid cascade hypothesis.' *Folia Neuropathologica*, 3(3), 211–225. Retrieved November 15, 2014, from <http://www.termedia.pl/doi/10.5114/fn.2014.45562>

Association, A. (2018). 2018 Alzheimer's disease facts and figures includes a special report on the financial and personal benefits of early diagnosis. *Alzheimers Dement*, 14(3), 367–429. Retrieved from https://www.alz.org/documents_custom/2018-facts-and-figures.pdf

Atlas, A. M. B. (2009). Allen Brain Atlas. *Allen Mouse Brain Atlas*. Retrieved from <http://mouse.brain-map.org>

Audrain, M., Souchet, B., Alves, S., Fol, R., Viode, A., Haddjeri, A., Tada, S., et al. (2018). β APP Processing Drives Gradual Tau Pathology in an Age-Dependent Amyloid Rat Model of Alzheimer's Disease. *Cerebral cortex (New York, N.Y. : 1991)*, 28(11), 3976–3993.

Balderas, I., Rodriguez-Ortiz, C. J., Salgado-Tonda, P., Chavez-Hurtado, J., McGaugh, J. L., & Bermudez-Rattoni, F. (2008). The consolidation of object and context recognition memory involve different regions of the temporal lobe. *Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 15(9), 618–24. Retrieved January 27, 2015, from

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2632790&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Baranello, R. J., Bharani, K. L., Padmaraju, V., Chopra, N., Lahiri, D. K., Greig, N. H., Pappolla, M. A., et al. (2015). Amyloid-beta protein clearance and degradation (ABCD) pathways and their role in Alzheimer's disease. *Current Alzheimer research*.

Bekris, L. M., Yu, C.-E., Bird, T. D., & Tsuang, D. W. (2010). Genetics of Alzheimer disease. *Journal of geriatric psychiatry and neurology*, 23(4), 213–27. Retrieved November 22, 2014, from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3044597&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

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

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

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

Booze, R. M., Mactutus, C. F., Gutman, C. R., & Davis, J. N. (1993). Frequency analysis of catecholamine axonal morphology in human brain. II. Alzheimer's disease and hippocampal sympathetic ingrowth. *Journal of the Neurological Sciences*, 119(1), 110–118.

Castellani, R. J., Rolston, R. K., & Smith, M. A. (2010). Alzheimer disease.

Disease-a-month : DM, 56(9), 484–546. Retrieved January 1, 2015, from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2941917&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Chakroborty, S., Kim, J., Schneider, C., Jacobson, C., Molgo, J., & Stutzmann, G. E. (2012). Early Presynaptic and Postsynaptic Calcium Signaling Abnormalities Mask Underlying Synaptic Depression in Presymptomatic Alzheimer's Disease Mice. *Journal of Neuroscience*, 32(24), 8341–8353. Retrieved from <http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.0936-12.2012>

Cho, Y. H., Friedman, E., & Silva, A. J. (1998). Ibotenate lesions of the hippocampus impair spatial learning but not contextual fear conditioning in mice. *Behavioural Brain Research*, 98(1), 77–87.

Chow, V. W., Mattson, M. P., Wong, P. C., & Gleichmann, M. (2010). An Overview of APP Processing Enzymes and Products. *NeuroMolecular Medicine*, 12(1), 1–12. Retrieved from <http://link.springer.com/10.1007/s12017-009-8104-z>

Cordella, A., Krashia, P., Nobili, A., Pignataro, A., La Barbera, L., Viscomi, M. T., Valzania, A., et al. (2018). Dopamine loss alters the hippocampus-nucleus accumbens synaptic transmission in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Disease*, 116(March), 142–154. Elsevier. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2018.05.006>

Cortés, R., Probst, A., & Palacios, J. (1988). Decreased densities of dopamine D1 receptors in the putamen and hippocampus in senile dementia of the Alzheimer type. *Brain Research*, 475(1), 164–167. Retrieved February 17, 2015, from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0006899388902120>

Creighton, S. D., Mendell, A. L., Palmer, D., Kalisch, B. E., MacLusky, N. J., Prado, V. F., Prado, M. A. M., et al. (2019). Dissociable cognitive

impairments in two strains of transgenic Alzheimer's disease mice revealed by a battery of object-based tests. *Scientific Reports*, 9(1), 57. Retrieved from <http://www.nature.com/articles/s41598-018-37312-0>

Davies, P., & Maloney, A. J. (1976). Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet*, 2(8000), 1403. Retrieved January 11, 2015, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/63862>

De-paula, V. J., Radanovic, M., & Diniz, B. S. (2012). Alzheimer's Disease. In J. R. Harris (Ed.), *Protein Aggregation and Fibrillogenesis in Cerebral and Systemic Amyloid Disease*, Subcellular Biochemistry (Vol. 65, pp. 329–352). Dordrecht: Springer Netherlands. Retrieved October 13, 2014, from <http://link.springer.com/10.1007/978-94-007-5416-4>

Delobette, S., Privat, A., & Maurice, T. (1997). In vitro aggregation facilitates beta-amyloid peptide-(25-35)-induced amnesia in the rat. *European journal of pharmacology*, 319(1), 1–4. Retrieved May 28, 2018, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9030890>

Galimberti, D., Ghezzi, L., & Scarpini, E. (2013). Immunotherapy against amyloid pathology in Alzheimer's disease. *Journal of the neurological sciences*, 333(1–2), 50–4. Retrieved January 27, 2015, from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022510X12006375>

Ghasemi, R., Zarifkar, A., Rastegar, K., Maghsoudi, N., & Moosavi, M. (2014). Repeated intra-hippocampal injection of beta-amyloid 25-35 induces a reproducible impairment of learning and memory: Considering caspase-3 and MAPKs activity. *European Journal of Pharmacology*, 726(1), 33–40. Elsevier. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.11.034>

Giorgetti, S., Greco, C., Tortora, P., & Aprile, F. A. (2018). Targeting amyloid aggregation: An overview of strategies and mechanisms. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(9).

- Guzmán-Ramos, K., Moreno-Castilla, P., Castro-Cruz, M., McGaugh, J. L., Martínez-Coria, H., LaFerla, F. M., & Bermúdez-Rattoni, F. (2012). Restoration of dopamine release deficits during object recognition memory acquisition attenuates cognitive impairment in a triple transgenic mice model of Alzheimer's disease. *Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 19(10), 453–60. Retrieved October 17, 2014, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22984283>
- Hall, A. M., & Roberson, E. D. (2012). Mouse Models of Alzheimer ' s Disease. *Brain Res Bull.*, 88(1), 259–273. Retrieved from http://rd.springer.com/chapter/10.1007/978-1-84628-440-3_16
- Hardy, J. A., & Higgins, G. A. (1992). Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science (New York, N.Y.)*, 256(5054), 184–5. Retrieved January 17, 2015, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1566067>
- Himeno, E., Ohyagi, Y., Ma, L., Nakamura, N., Miyoshi, K., Sakae, N., Motomura, K., et al. (2011). Apomorphine treatment in Alzheimer mice promoting amyloid-beta degradation. *Annals of Neurology*, 69(2), 248–256. Retrieved December 2, 2014, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21387370>
- Holtzman, D. M., Morris, J. C., & Goate, A. M. (2011). STATE OF THE ART REVIEW Alzheimer ' s Disease : The Challenge of the Second Century. *Science Translational Medicine*, 3(77).
- Huong, V. T., Shimanouchi, T., Shimauchi, N., Yagi, H., Umakoshi, H., Goto, Y., & Kuboi, R. (2010). Catechol derivatives inhibit the fibril formation of amyloid-beta peptides. *Journal of bioscience and bioengineering*, 109(6), 629–34. The Society for Biotechnology, Japan. Retrieved November 24, 2014, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20471605>
- Jean, Y. Y., Baleriola, J., Fà, M., Hengst, U., & Troy, C. M. (2015). Stereotaxic Infusion of Oligomeric Amyloid-beta into the Mouse Hippocampus. *Journal of Visualized Experiments*, (100), 1–7. Retrieved from

<http://www.jove.com/video/52805/stereotaxic-infusion-oligomeric-amyloid-beta-into-mouse>

Jürgensen, S., Antonio, L. L., Mussi, G. E. A., Brito-Moreira, J., Bomfim, T. R., De Felice, F. G., Garrido-Sanabria, E. R., et al. (2011). Activation of D1/D5 dopamine receptors protects neurons from synapse dysfunction induced by amyloid-beta oligomers. *The Journal of biological chemistry*, *286*(5), 3270–6. American Society for Biochemistry and Molecular Biology. Retrieved August 1, 2017, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21115476>

Kandel, E. R., Dudai, Y., & Mayford, M. R. (2014). Review The Molecular and Systems Biology of Memory. *Cell*, *157*(1), 163–186. Elsevier Inc. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.001>

Kempadoo, K. A., Mosharov, E. V, Choi, S. J., Sulzer, D., & Kandel, E. R. (2016). Dopamine release from the locus coeruleus to the dorsal hippocampus promotes spatial learning and memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *113*(51), 201616515. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27930324>

Kemppainen, N., Laine, M., Laakso, M. P., Kaasinen, V., Nägren, K., Vahlberg, T., Kurki, T., et al. (2003). Hippocampal dopamine D2 receptors correlate with memory functions in Alzheimer's disease. *European Journal of Neuroscience*, *18*(April), 149–154.

Kim, J., Basak, J., & Holtzman, D. (2009). The role of lipoprotein E in Alzheimer's disease. *Neuron*, *63*(3), 287–303. Retrieved December 3, 2014, from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0896627309005492>

Klyubin, I., Walsh, D. M., Lemere, C. a, Cullen, W. K., Shankar, G. M., Betts, V., Spooner, E. T., et al. (2005). Amyloid beta protein immunotherapy neutralizes Abeta oligomers that disrupt synaptic plasticity in vivo. *Nature medicine*, *11*(5), 556–561.

- Koch, G., Di Lorenzo, F., Bonni, S., Giacobbe, V., Bozzali, M., Caltagirone, C., & Martorana, A. (2014). Dopaminergic Modulation of Cortical Plasticity in Alzheimer's Disease Patients. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 2654–2661. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24859851>
- Langille, J. J., & Brown, R. E. (2018). The Synaptic Theory of Memory: A Historical Survey and Reconciliation of Recent Opposition. *Frontiers in Systems Neuroscience*. Retrieved from <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fnsys.2018.00052/full>
- Li, J., Zhu, M., Manning-Bog, A., Monte, D. Di, & Fink, A. (2004). Dopamine and L-dopa disaggregate amyloid fibrils: implications for Parkinson's and Alzheimer's disease. *The FASEB journal*, 22, 1–22. Retrieved December 2, 2014, from <http://www.fasebj.org/content/18/9/962.short>
- Liu, C.-C., Zhao, N., Fu, Y., Wang, N., Linares, C., Tsai, C.-W., & Bu, G. (2017). ApoE4 Accelerates Early Seeding of Amyloid Pathology. *Neuron*, 96(5), 1024–1032.e3. Retrieved from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896627317310668>
- Liu, Y., Yoo, M.-J., Savonenko, A., Stirling, W., Price, D. L., Borchelt, D. R., Mamounas, L., et al. (2008). Amyloid pathology is associated with progressive monoaminergic neurodegeneration in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 28(51), 13805–13814.
- Martorana, A., & Koch, G. (2014). Is dopamine involved in Alzheimer's disease? *Frontiers in Aging Neuroscience*, 6(September), 1–6. Retrieved September 26, 2014, from http://www.frontiersin.org/Aging_Neuroscience/10.3389/fnagi.2014.00252/abstract
- McLarnon, J. G. (2014). Correlated inflammatory responses and

neurodegeneration in peptide-injected animal models of Alzheimer's disease. *BioMed Research International*, 2014. Hindawi Publishing Corporation.

Moreno-Castilla, P., Guzman-Ramos, K., & Bermudez-Rattoni, F. (2018). Object Recognition and Object Location Recognition Memory – The Role of Dopamine and Noradrenaline. *Handbook of Behavioral Neuroscience*, 27, 403–413.

Moreno-Castilla, P., Pérez-Ortega, R., Violante-Soria, V., Balderas, I., & Bermúdez-Rattoni, F. (2017). Hippocampal release of dopamine and norepinephrine encodes novel contextual information. *Hippocampus*. Retrieved February 21, 2017, from <http://doi.wiley.com/10.1002/hipo.22711>

Moreno-Castilla, P., Rodriguez-Duran, L. F., Guzmán-Ramos, K., Bárcenas-Femat, A., Escobar, M. L., & Bermúdez-Rattoni, F. (2016). Dopaminergic neurotransmission dysfunction induced by β -amyloid transforms cortical LTP into LTD and produces memory impairment. *Neurobiology of aging*.

Morris, R. (2008). Morris water maze. *Scholarpedia*, 3(8), 6315. Retrieved May 10, 2016, from http://www.scholarpedia.org/article/Morris_water_maze

Morris, R. G., Garrud, P., Rawlins, J. N., & O'Keefe, J. (1982). Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature*.

Mucke, L., & Selkoe, D. J. (2012). Neurotoxicity of amyloid β -protein: synaptic and network dysfunction. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 2(7), a006338. Retrieved October 30, 2014, from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3385944&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Murphy, M. P., & LeVine III, H. (2010). Alzheimer's Disease and the Beta amyloid Peptide. *J Alzheimers Dis*, 19(1), 1–17.

Mustapic, M., Presecki, P., Pivac, N., Mimica, N., Hof, P. R., Simic, G.,

- Folnegovic-Smalc, V., et al. (2013). Genotype-independent decrease in plasma dopamine beta-hydroxylase activity in Alzheimer's disease. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 44, 94–99.
- Nicoll, R. A. (2017). A Brief History of Long-Term Potentiation. *Neuron*, 93(2), 281–290. Retrieved January 30, 2017, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28103477>
- Nobili, A., Latagliata, E. C., Viscomi, M. T., Cavallucci, V., Cutuli, D., Giacobazzo, G., Krashia, P., et al. (2017). ARTICLE Dopamine neuronal loss contributes to memory and reward dysfunction in a model of Alzheimer's disease. *Nature Communications*, 8. Retrieved August 1, 2017, from <https://www.nature.com/articles/ncomms14727.pdf>
- Ono, K., Takasaki, J.-I., Takahashi, R., Ikeda, T., & Yamada, M. (2013). Effects of antiparkinsonian agents on β -amyloid and α -synuclein oligomer formation in vitro. *Journal of neuroscience research*, 91(10), 1371–81. Retrieved November 24, 2014, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23913715>
- Perry, E. K., Gibson, P. H., Blessed, G., Perry, R. H., & Tomlinson, B. E. (1977). Neurotransmitter enzyme abnormalities in senile dementia. Choline acetyltransferase and glutamic acid decarboxylase activities in necropsy brain tissue. *Journal of the neurological sciences*, 34(2), 247–65. Retrieved January 27, 2015, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/144789>
- Platt, T. L., Reeves, V. L., & Murphy, M. P. (2013). Transgenic models of Alzheimer's disease: Better utilization of existing models through viral transgenesis. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1832(9), 1437–1448. Elsevier B.V. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.04.017>
- Rammes, G., Gravius, A., Ruitenbergh, M., Wegener, N., Chambon, C., Sroka-Saidi, K., Jeggo, R., et al. (2015). MRZ-99030 - A novel modulator of A β aggregation: II - Reversal of A β oligomer-induced deficits in long-term

potentiation (LTP) and cognitive performance in rats and mice. *Neuropharmacology*, 92(January), 170–182. Elsevier Ltd. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.12.037>

Reinke, A., & Gestwicki, J. (2011). Insight into Amyloid Structure Using Chemical Probes. *Chemical biology & drug design*, 77(6), 399–411. Retrieved December 3, 2014, from <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1747-0285.2011.01110.x/full>

Ridge, P., Ebbert, M., & Kauwe, J. (2013). Genetics of Alzheimer disease. *Biomed Research International*, 2013, 13. Retrieved December 3, 2014, from <http://jgp.sagepub.com/content/23/4/213.short>

Robledo, L. M., Peña G, M., Rojas R, P., & Martinez, A. (Eds.). (2016). *La enfermedad de Alzheimer y otras demenchoas como problema nacional de salud*. México: InterSistemas.

Roediger, H. L., Dudai, Y., & Fitzpatrick, S. M. (2007). *Science of Memory: Concepts*. *Science of Memory: Concepts*.

Sasaguri, H., Nilsson, P., Hashimoto, S., Nagata, K., Saito, T., De Strooper, B., Hardy, J., et al. (2017). APP mouse models for Alzheimer's disease preclinical studies. *The EMBO Journal*, 36(17), 2473–2487. Retrieved from <http://emboj.embopress.org/lookup/doi/10.15252/emboj.201797397>

Schneider, L. S. (2013). Alzheimer Disease Pharmacologic treatment and treatment research. *Continuum (Minneap Minn)*, 19(2), 339–357.

Selkoe, D. J. (2001). Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiological reviews*, 81(2), 741–766. Retrieved December 3, 2014, from <http://physrev.physiology.org/content/81/2/741.short>

Selkoe, D. J. (2001). Clearing the Brain's Amyloid Cobwebs. *Neuron*, 32(2), 177–180. Retrieved January 27, 2015, from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0896627301004755>

- Selkoe, D. J. (2002). Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science (New York, N.Y.)*, 298(5594), 789–91. Retrieved July 15, 2014, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12399581>
- Selkoe, D. J., & Hardy, J. (2016). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Molecular Medicine*, 8(6), 595–608. Retrieved from http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-3-642-81991-9_5
- Sevigny, J., Chiao, P., Bussière, T., Weinreb, P. H., Williams, L., Maier, M., Dunstan, R., et al. (2016). The antibody aducanumab reduces A β plaques in Alzheimer's disease. *Nature*, 537(7618).
- Shankar, G. M., Bloodgood, B. L., Townsend, M., Walsh, D. M., Selkoe, D. J., & Sabatini, B. L. (2007). Natural oligomers of the Alzheimer amyloid-beta protein induce reversible synapse loss by modulating an NMDA-type glutamate receptor-dependent signaling pathway. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 27(11), 2866–2875.
- Sharma, S., Verma, S., Kapoor, M., Saini, A., & Nehru, B. (2016). Alzheimer's disease like pathology induced six weeks after aggregated amyloid-beta injection in rats: increased oxidative stress and impaired long-term memory with anxiety-like behavior. *Neurological Research*.
- Sheng, M., Sabatini, B. L., & Sudhof, T. C. (2012). Synapses and Alzheimer's Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(5), a005777–a005777. Retrieved September 6, 2017, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22491782>
- Smith, J. A., & Knight, R. G. (2002). Memory processing in Alzheimer's disease. *Neuropsychologia*.
- Sperling, R. A., Dickerson, B. C., Pihlajamaki, M., Vannini, P., LaViolette, P. S., Vitolo, O. V., Hedden, T., et al. (2010). Functional Alterations in Memory

Networks in Early Alzheimer's Disease. *NeuroMolecular Medicine*, 12(1), 27–43. Retrieved from <http://link.springer.com/10.1007/s12017-009-8109-7>

Stefani, A., Olivola, E., Liguori, C., Hainsworth, A. H., Saviozzi, V., Angileri, G., D'Angelo, V., et al. (2015). Catecholamine-Based Treatment in AD Patients: Expectations and Delusions. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 7. Retrieved from <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fnagi.2015.00067/abstract>

Storga, D., Vrecko, K., Birkmayer, J. G. D., & Reibnegger, G. (1996). Monoaminergic neurotransmitters, their precursors and metabolites in brains of Alzheimer patients. *Neuroscience Letters*, 203, 29–32.

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

Vadukul, D. M., Gbajumo, O., Marshall, K. E., & Serpell, L. C. (2017). Amyloidogenicity and toxicity of the reverse and scrambled variants of amyloid- b 1-42, 591, 822–830.

Viggiano, M. P., Galli, G., Righi, S., Brancati, C., Gori, G., & Cincotta, M. (2008). Visual recognition memory in Alzheimer's disease: Repetition-lag effects. *Experimental Aging Research*, 34(3), 267–281.

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

Vogel-Ciernia, A., & Wood, M. A. (2014). Examining object location and object recognition memory in mice. *Current protocols in neuroscience / editorial board, Jacqueline N. Crawley ... [et al.]*, 69, 8.31.1-8.31.17. Retrieved

September 21, 2015, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25297693>

West, M. J. (2012). Introduction to stereology. *Cold Spring Harbor Protocols*, 7, 843–851.

West, M. J. (2018). Space Balls Revisited: Stereological Estimates of Length With Virtual Isotropic Surface Probes. *Frontiers in Neuroanatomy*, 12(June), 1–6. Retrieved from <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fnana.2018.00049/full>

Wong, R. S., Cechetto, D. F., & Whitehead, S. N. (2016). Assessing the Effects of Acute Amyloid β Oligomer Exposure in the Rat. *Int. J. Mol. Sci.*

Zussy, C., Brureau, A., Delair, B., Marchal, S., Keller, E., Ixart, G., Naert, G., et al. (2011a). Time-course and regional analyses of the physiopathological changes induced after cerebral injection of an amyloid β fragment in rats. *The American journal of pathology*, 179(1), 315–34. Retrieved October 29, 2018, from <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002944011003373>

Zussy, C., Brureau, A., Delair, B., Marchal, S., Keller, E., Ixart, G., Naert, G., et al. (2011b). Time-course and regional analyses of the physiopathological changes induced after cerebral injection of an amyloid β fragment in rats suplementarias. *The American journal of pathology*, 179(1), 315–34. American Society for Investigative Pathology. Retrieved May 28, 2018, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21703413>