



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Estimulación repetitiva de las terminales catecolaminérgicas del hipocampo en la memoria a largo plazo en modelos de enfermedad de Alzheimer

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Cecilia Gabriela Acevedo Huerta

TUTOR PRINCIPAL

Federico Bermúdez Rattoni
[Instituto de Fisiología Celular](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Ana Brígida Clorinda Arias Álvarez
[Instituto de Investigaciones Biomédicas](#)
Martha Lilia Escobar Rodríguez
[Facultad de Psicología, UNAM](#)

Ciudad de México. Abril, 2023.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Índice

	Página
Resumen.....	6
1. Introducción.....	7
1.1. Enfermedad de Alzheimer.....	7
1.2. Producción del péptido βA.....	8
1.3. Hiperfosforilación de la proteína-tau.....	11
1.4. Etiología de la enfermedad.....	11
1.5. Bases genéticas de la enfermedad de Alzheimer.....	12
1.6. Sistema catecolaminérgico y enfermedad de Alzheimer.....	14
1.7. Locus Coeruleus.....	16
1.8. Antecedentes.....	21
2. Hipótesis.....	26
3. Objetivos.....	26
4. Metodología.....	27
4.1. Sujetos.....	27
4.2. Genotificación.....	28
4.3. Cirugía estereotáxica.....	31
4.4. Estimulación optogenética.....	33
4.5. Microdiálisis en libre movimiento.....	33
4.6. Memoria de localización de objeto.....	35
4.7. Laberinto acuático.....	37
4.8. Inmunohistoquímica.....	39

4.9.	<u>Análisis estadísticos.....</u>	40
5.	<u>Resultados.....</u>	41
5.1.	<u>Infección de los somas de neuronas catecolaminérgicas en el LC</u>	41
5.2.	<u>La actividad motora aumenta durante la estimulación.....</u>	42
5.3.	<u>Las optoestimulaciones repetitivas causaron un aumento en la liberación de DA en los animales TH-Cre.....</u>	44
5.4.	<u>Las optoestimulaciones repetitivas previnieron un déficit en la memoria de OLM en los animales 4x AD-TH.....</u>	45
5.5.	<u>Memoria del laberinto acuático</u>	47
6.	<u>Discusión.....</u>	49
7.	<u>Conclusiones.....</u>	54
8.	<u>Referencias.....</u>	56

Abreviaturas

β A	Proteína β -amiloide
AAV	Virus adeno-asociado
ADQ	Adquisición
AICD	Dominio intracelular amiloide
AMPc	Adenosín Monofosato Cíclico
ApoE	Apolipoproteína E
BACE1	β -secretasa 1
APP	Proteína precursora de amiloide
AD	Enfermedad de Alzheimer
CA1	Cuerno de Amón 1
Ca ²⁺	Calcio
CAMKII	Clase de enzimas de proteína cinasa dependiente de Calcio II
CHR2	Canal de rodopsina-2
DA	Dopamina
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DDC	DOPA-descarboxilasa
DBH	Dopamina beta-hidroxilasa
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPSS	Diode-pumped solid-state
EC-LIF	Electroforesis capilar con detección por fluorescencia inducida por láser
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EE	Exposición a ambientes enriquecidos
EYFP	Enhanced Yellow Fluorescent Protein
FAD	Enfermedad de Alzheimer tipo familiar
GABA	Acido γ -aminobutírico
GLU	Glutamato
IFC	Instituto de Fisiología Celular
LAD	Enfermedad de Alzheimer de comienzo tardío
LC	Locus Coeruleus
L-DOPA	L-3,4-dihidroxifenilalanina
LTM	Memoria a largo plazo
LTP	Potenciación a largo plazo
MAP	Proteína asociada a microtúbulos
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógenos
MW	Laberinto Acuático
NA	Noradrenalina
Na ⁺	Sodio
NaOH	Hidróxido de Sodio
NMDA	Ácido N-metil-D-aspártico
nTg	No transgénico
OLM	Memoria de localización de objetos
ORM	Memoria de reconocimiento de objetos
PFA	Paraformaldehído
PKA	Proteína cinasa A

PSN1/2	Presenilina 1/2
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SEM	Error estándar muestral
SSI	Solución salina isotónica
SNPc	Substancia <i>Nigra pars compacta</i>
TBS	Buffer de trizma base salina
TBS-BSA	TBS con albúmina de suero bovino
TBS-T	TBS con Tritón
Tg	Transgénico
TH	Tirosina Hidroxilasa
TH-Cre	Ratón con el transgén de la Cre-recombinasa bajo el promotor de TH
Tris-HCl	Trisaminometano-ácido clorhídrico
Tyr	Tirosina
VTA	Área Tegmental Ventral
WT	Tipo silvestre
3xTgAD	Triple transgénico para la enfermedad de Alzheimer
4x AD-TH	Modelo creado a partir de la cruce de ratones TH-Cre con ratones 3xTgAD

Resumen

La demencia se refiere a un grupo de síntomas que generan un deterioro grave de la función cerebral y que causan desórdenes cognitivos, de memoria y conductuales. La enfermedad de Alzheimer (AD) es la causa más común de demencia y está caracterizada por la acumulación patológica del péptido β -amiloide (β A) y por la formación de ovillos neurofibrilares. Recientemente, ha cambiado el enfoque etiológico que se tenía de la enfermedad, de una perspectiva “neuro-céntrica” a una “vista-integrada” que reconoce la sinérgica de diferentes regiones cerebrales, así como de los diferentes sistemas de neurotransmisión implicados. En este sentido el sistema catecolaminérgico ha cobrado importancia debido a que estudios recientes han mostrado que una mejoría en el funcionamiento del sistema monoaminérgico puede restaurar la función cognitiva y reducir la patología en modelos animales de neurodegeneración. También se ha observado que la depleción cortical de catecolaminas en el modelo de AD 3xTg-AD correlaciona con la acumulación local de β A y que incrementar los niveles de dopamina (DA) y noradrenalina (NA) rescata la potenciación a largo plazo (LTP) así como el desempeño en tareas de memoria. Además, se ha visto daño en estructuras principalmente catecolaminérgicas como el Locus coeruleus (LC) en etapas muy tempranas del desarrollo de la patología. Y se ha determinado que la degeneración en este núcleo correlaciona mejor con las placas, con los ovillos neurofibrilares y con los déficits cognitivos que con la muerte neuronal en otras áreas.

Por otra parte, se sabe que el sistema catecolaminérgico está relacionado con la mejoría que se observa tras la exposición a ambientes enriquecidos (EE) en modelos de AD. La exposición a EE revierte los déficits de memoria e incluso previene la acumulación de β A. Se ha observado también que la exposición repetida a la novedad, un componente clave de los EE, aumenta la actividad catecolaminérgica ejerciendo un efecto protector contra la toxicidad amiloide y esto a su vez previene el deterioro en el desempeño cognitivo. Esto resulta relevante para el presente trabajo, ya que se ha demostrado que la exploración de la novedad causa un aumento en la actividad del LC e incrementa la liberación hipocampal de NA, además, en modelos animales se ha visto que la inducción de la liberación de DA de terminales del LC hacia el hipocampo dorsal CA1, mejora el aprendizaje espacial. Esto llevo al grupo de trabajo en el que fue desarrollada la presente tesis a formular la pregunta de si la estimulación optogenética repetitiva de la vía LC-CA1, tendría un efecto en la prevención de los déficits de memoria en un modelo murino de AD. Se propuso estimular con esta metodología ya que esta técnica permite manipular vías específicas en modelos *in vivo*. Para poder estimular únicamente neuronas catecolaminérgicas se utilizó un método de expresión de genes cre-lox, lo que requirió utilizar un ratón transgénico que expresara la cre-recombinasa bajo el promotor de la enzima tirosina hidroxilasa (TH) y para demostrar el papel de la optoestimulación en un modelo de AD, se recurrió al ratón 4x AD-TH, que es un modelo creado a partir de la cruce de ratones TH-Cre con ratones 3xTgAD. Se encontró que la optoestimulación repetitiva de las terminales catecolaminérgicas del LC hacia el hipocampo en ratones TH-Cre, produce un aumento en la liberación de DA. También se encontró que en los ratones 4xAD-TH estas optoestimulaciones son capaces de prevenir los déficits de memoria observados en una tarea de memoria de localización de objeto (OLM).

1. Introducción

1.1. Enfermedad de Alzheimer

La demencia se refiere a un grupo de síntomas que generan un deterioro grave de la función cerebral y que causan desordenes cognitivos, de memoria, y conductuales. La enfermedad de Alzheimer (AD) es la causa más común de demencia representando del 50 al 60% de todos los casos. La prevalencia de demencia en occidente está por debajo del 1% en individuos de 60 a 64 años, pero muestra un aumento exponencial con la edad, por lo que la prevalencia en gente de 85 años o mayor crece al 24-33%, en el mundo occidental. Esto resulta importante ya que tan solo en la población de Estados Unidos, se estima que para el 2025 habrá 7.1 millones de personas con AD y 13 millones para el 2050. Además, un segmento especial de la población que comprende a los mayores de 90 años es actualmente el que más rápido está creciendo y en el que existe un mayor riesgo para presentar la enfermedad (Blennow et al, .2006; Oboudiyat et al., 2013). En México, la incidencia de AD es de 27.3 por cada 1000 personas, al año. En el 2014, alrededor de 86,000 personas fueron diagnosticadas con AD y estudios de proyección muestran que este número incrementará a 3.5 millones para el 2050 (Gutierrez & Cruz, 2015).

La enfermedad de Alzheimer es un desorden que avanza lentamente, caracterizado por la pérdida progresiva de la memoria episódica, incluyendo también otros signos como: afasia, apraxia, agnosia; junto con síntomas cognitivos como; pérdida del juicio, pérdida de la capacidad de tomar decisiones, deficiencias en las habilidades para comunicarse, desorientación y pérdida del razonamiento. Así también incluye alteraciones conductuales importantes como, apatía, agitación o incluso psicosis. La AD es una enfermedad

multisistémica que implica diversos síntomas y deficiencias (Blennow et al., 2006; Samanta et al., 2006).

Esta enfermedad está caracterizada por la acumulación patológica del péptido β amiloide (β A) y la proteína tau (τ) hiperfosforilada, quien se acumula formando ovillos neurofibrilares (Bostancıoğlu, 2020). La patogénesis de la enfermedad es un tema de cierta controversia, sin embargo, actualmente la hipótesis predominante es la de la cascada amiloide, la cual sitúa la acumulación del péptido β A en el centro del proceso neurodegenerativo y sostiene que la acumulación de éste actúa como desencadenante patológico de una cascada de sucesos, que incluyen; lesiones neuríticas, formación de ovillos neurofibrilares, respuestas inflamatorias por parte de la glía, etc.; procesos que finalmente llevan a muerte y disfunción neuronal (Barage & Sonawane, 2015).

1.2 Producción del péptido β A

Los péptidos β A contienen de 36 a 43 aminoácidos y son productos naturales del metabolismo. Los monómeros de β A40 son más prevalentes que las especies β A42 dañinas y propensas a la agregación. El péptido β A se origina de la proteólisis de la proteína precursora de amiloide (APP) que es una proteína transmembranal tipo 1 producida por muchos tipos celulares (Querfurth & Laferla, 2010; Selkoe, 2004). En el sistema nervioso central la APP puede sufrir una escisión secuencial a través de dos diferentes vías, una vía amiloidogénica y otra no amiloidogénica. En la vía no amiloidogénica, la APP es digerida por la enzima α -secretasa, resultando un producto extracelular llamado sAPP α y un fragmento C-terminal unido a membrana de 83 aminoácidos, llamado C83. En ambas vías el segundo paso involucra un corte de la γ -secretasa. El corte de C83 de la γ -secretasa produce otro fragmento llamado p3 y deja el dominio intracelular APP (AICD) unido a la

membrana. En la vía amiloidogénica, la APP es escindida por la β -secretasa (o BACE-1) produciendo el producto extracelular llamado sAPP β y un fragmento C terminal de 99 aminoácidos, llamado C99. Después el procesamiento de γ -secretasa de C99 resulta en la secreción extracelular de β A y la misma AICD unida a membrana (Soria Lopez et al., 2019) (figura 1).

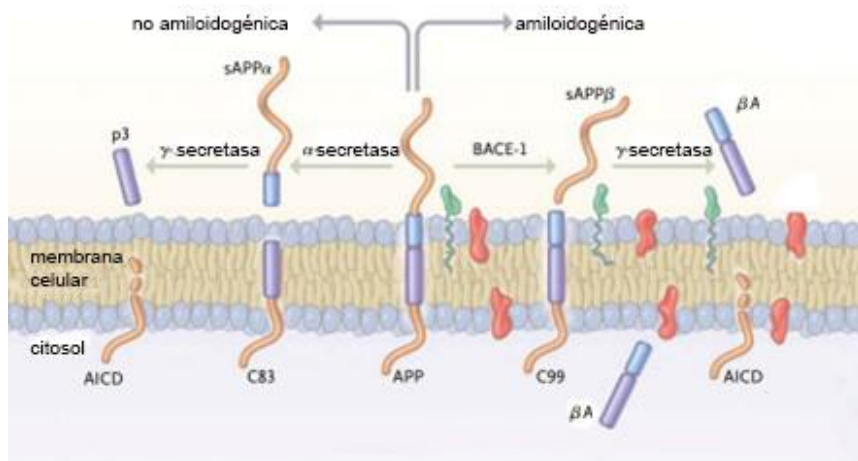


Figura 1. Procesamiento de la proteína precursora de amiloide. La vía no amiloidogénica comienza con el procesamiento de APP por la α -secretasa quien escinde y libera un ectodominio de proteína precursora amiloide largo (sAPP α), dejando un fragmento c terminal de 83 residuos, C83, quien después es escindido por γ -secretasa, que libera p3 extracelular y deja un dominio intracelular amiloide (AICD). El procesamiento amiloidogénico es iniciado por la β -secretasa, o BACE-1, que libera sAPP β , dejando un fragmento c terminal de 99 residuos, C99. El C99 también es procesado por γ -secretasa resultando en la secreción de β A y dejando la misma AICD (modificado de Querfurth & Laferla, 2010).

Los péptidos β A se produce de forma constitutiva durante el metabolismo celular normal, sin embargo, el cambio bioquímico clave de la AD es la acumulación excesiva de estos péptidos amiloides solubles per-se no tóxicos en los espacios intra y extracelulares que alteran la proteostasis y desencadenan modificaciones de β A (por ejemplo, por especies reactivas de oxígeno ROS) produciendo péptidos β A intermedios tóxicos, péptidos β A solubles mal plegados, dímeros, oligómeros, estructuras fibrilares y finalmente, placas seniles cerebrales extracelulares, compuestas de depósitos proteínicos con estructura secundaria de hoja β (Jeong, 2017). Las placas amiloides representan una de las

características fisiopatológicas más sobresaliente de la AD, sin embargo, se sugiere que los principales responsables de los déficits neurológicos son los agregados oligoméricos solubles de β A. La agregación de proteínas es un proceso aberrante de autoasociación que puede producir entidades macroscópicas como los agregados extracelulares del péptido β A que se encuentran en el cerebro de muchos pacientes con AD. Este proceso procede, tanto *in vitro* como *in vivo*, a través de varios estados de agregación intermedios, que van desde pequeñas especies oligoméricas solubles formadas por 2-50 péptidos, hasta agregados filamentosos insolubles a partir de los cuales se forman las placas (Demuro et al., 2010).

Las placas densas son tóxicas para el parénquima cerebral que las rodea. Muchas neuritas que se encuentran rodeando a las placas exhiben morfologías hinchadas, distróficas y a menudo contienen agregados de la proteína τ hiperforforilada y múltiples componentes celulares que probablemente se acumulan debido a la interrupción del transporte celular. También se ha observado que alrededor de las placas hay una substancial gliosis, lo cual contribuye a la disfunción sináptica (Spires-Jones & Hyman, 2014).

Por otra parte, una buena cantidad de evidencia sugiere que los oligómeros solubles de β A contribuyen a la disfunción y pérdida sináptica actuando en múltiples receptores sinápticos, incluyendo los receptores glutamatérgicos tipo NMDA (N-metil-D-aspartato) y los receptores colinérgicos tipo α 7-nicotínicos (α 7-nACh) (Jeong, 2017). Además, los oligómeros de β A interactúan con células neuronales y gliales conduciendo a la activación de cascadas proinflamatorias, disfunción mitocondrial, aumento de estrés oxidante; disfunción de vías de señalización intracelulares y de plasticidad sináptica; desregulación del metabolismo de calcio, inducción de apoptosis y muerte neuronal (De-Paula et al., 2012).

1.3 Hiperfosforilación de la proteína tau (τ)

Otra de las características fisiopatológicas de la enfermedad es la hiperfosforilación de la proteína tau. Tau es una proteína asociada a microtúbulos (MAP) que participa en el mantenimiento de la microarquitectura compleja de las células neuronales, en el ensamblaje de microtúbulos y en la estabilización, particularmente en el axón, polimerizando tubulina a microtúbulos. Es esencial para establecer la polaridad de las células neuronales y para regular el crecimiento axonal durante el desarrollo, así como para mantener la morfología y el transporte axonal en células maduras. Tau realiza estas funciones uniéndose directamente a microtúbulos, regulando la dinámica de su crecimiento y acortamiento. Es una fosfoproteína, cuya actividad biológica está regulada por el estado de su fosforilación. La fosforilación de tau reduce su afinidad a microtúbulos, por lo que también reduce su habilidad de regularlos (Feinstein & Wilson, 2005; Gao et al., 2018). En la AD existe hiperfosforilación que desregula su función y además lleva a su agregación en depósitos intraneuronales llamados ovillos neurofibrilares, los cuales son neurotóxicos (Drewes, 2004). La hiperfosforilación de tau está regulada por el balance de múltiples cinasas y fosfatasas. En la AD esta hiperfosforilación comienza intracelularmente y conduce al secuestro de la tau normal y de otras proteínas asociadas a microtúbulos, lo cual causa un desmontaje de éstos e impide el transporte axonal comprometiendo la función neuronal y sináptica (Blennow et al., 2006).

1.4 Etiología de la enfermedad

Se han planteado diferentes hipótesis en relación a la etiología de AD, incluyendo algunas basadas en: el envejecimiento; la degeneración de vías anatómicas tales como la vía colinérgica; factores ambientales como la exposición a aluminio, lesiones cerebrales y

desnutrición; factores genéticos; desórdenes metabólicos resultantes de disfunciones mitocondriales; factores vasculares como una comprometida barrera hematoencefálica; disfunción del sistema inmune y agentes infecciosos (Armstrong, 2013). Sin embargo, se ha llegado a la conclusión de que la AD es una enfermedad neurodegenerativa compleja con una etiología multifactorial. Algunas hipótesis actuales, como la de la patología de Tau y la de la cascada amiloide sólo explican parcialmente la fisiopatología del padecimiento. Probablemente ninguna hipótesis pueda, por sí misma dar cuenta de todos los aspectos que subyacen al proceso de la enfermedad, ni logre diferenciarlo del envejecimiento normal del cerebro (de Paula et al., 2009).

1.5 Bases genéticas de la enfermedad de Alzheimer

Una estrategia probada a lo largo del tiempo para establecer la causalidad en innumerables enfermedades es la genética; una vez identificados los genes en cuestión, subsecuentes investigaciones bioquímicas y celulares pueden determinar los mecanismos moleculares subyacentes. Esta es una estrategia que no ha podido aplicarse del todo a la AD, sin embargo, existen ciertas correlaciones genéticas. Para esto es preciso mencionar que esta patología suele subdividirse en dos tipos: familiar o AD de comienzo temprano (FAD) y esporádica o AD de comienzo tardío (LAD). La de tipo familiar resulta de mutaciones puntuales en los genes directamente relacionados con la producción de péptido β A, como el gen de la proteína precursora de amiloide (APP) en el cromosoma 21 o los relacionados con presenilina-1 (PS1) o presenilina-2 (PS2). Las proteínas de presenilina son las subunidades catalíticas del complejo γ -secretasa, complejo que junto con la β -secretasa 1 (BACE1) son necesarios para el procesamiento y secreción del péptido β A.

Por otro lado, la AD de tipo esporádico tiene cierto grado de heredabilidad ya que se ha relacionado con la presencia del alelo $\epsilon 4$ del gen de Apolipoproteína E (APOE). El gen polimórfico APOE en el cromosoma 19 da como producto a la Apolipoproteína E (ApoE), quien junto con la enzima degradadora de insulina (IDE) está involucrada en la depuración de péptidos βA (figura 2). Así también este tipo de Alzheimer se ha relacionado con otros factores de riesgo, como: historia de trauma cerebral con pérdida de conciencia; enfermedades cardiovasculares como, hipertensión, diabetes mellitus y dislipidemia; y un estilo de vida sedentario y de poca demanda cognitiva. El fenotipo neuropatológico y clínico entre los dos tipos de AD es generalmente indistinguible, siendo la diferencia más importante la edad de inicio de la patología. Normalmente el promedio de edad de inicio de la FAD es de 50 años y el de la LAD de 65 (de Paula et al., 2009; Feinstein & Wilson, 2005; Platt et al., 2013).

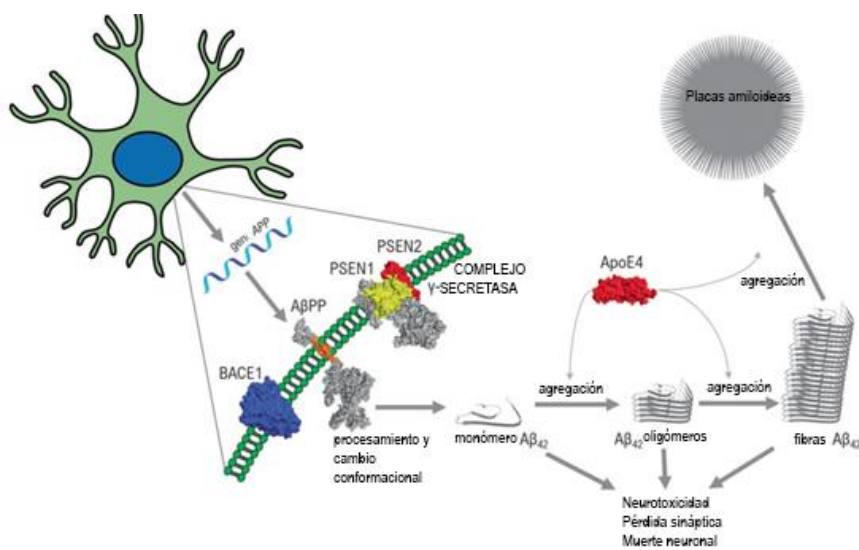


Figura 2. Hipótesis de la cascada amiloide. La expresión del gen de APP es seguida del procesamiento consecutivo por proteasas como la β secretasa 1 (BACE1) y el complejo de γ secretasa, compuesto por PSEN1 (presenilina 1), PSEN2 (presenilina 2), entre otras. Lo que da como resultado la liberación del péptido βA , incluyendo las especies reactivas de βA_{42} . βA_{42} continúa su procesamiento sufriendo cambios conformacionales y ensamblándose, conformando monómeros, oligómeros y fibras, las cuales son neurotóxicas y finalmente se agregan formando placas amiloideas. ApoE es capaz de limpiar o estabilizar los agregados de βA que de no ser removidos provocan neurotoxicidad, pérdida de sinapsis y muerte neuronal. (Modificado de Castellani et al., 2019)

1.6 Sistema catecolaminérgico y enfermedad de Alzheimer

Las catecolaminas dopamina (DA), noradrenalina (NA) y adrenalina son neurotransmisores que se sintetizan a través de un conjunto de pasos enzimáticos sucesivos; la presencia de enzimas de síntesis específicas en las diferentes células da como resultado diferentes fenotipos neuronales (Squire, 2013). La síntesis de estas catecolaminas comienza a partir del aminoácido L-tirosina, que es hidroxilado por la enzima tirosina hidroxilasa (TH) a L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA). Posteriormente, la L-DOPA pierde un grupo carboxilo gracias a la actividad de la enzima DOPA-descarboxilasa (DDC) y se convierte en DA. Posteriormente, la enzima dopamina β -hidroxilasa (DBH), presente únicamente en células noradrenérgicas y adrenérgicas, específicamente en vesículas, une un grupo hidroxilo a la DA que pasa a ser NA. Finalmente, la enzima feniletanolamina N-metiltransferasa (PNMT), presente únicamente en células adrenérgicas, une un grupo metilo a la NA convirtiéndola en adrenalina (Carlson, 2014; Dudas, 2014; Siegel, 1999).

Las principales vías catecolaminérgicas se originan de cuerpos celulares de neuronas dopaminérgicas localizadas en el cerebro medio. Estas están divididas en tres grupos: nigroestriatal, mesolímbico y tuberoinfundibular. En el sistema mesolímbico los cuerpos celulares de las neuronas están situados en el Área Tegmental Ventral (VTA) y proyectan sus axones a varias partes del sistema límbico, entre ellas; a la amígdala, al núcleo accumbens, al hipocampo, y a la neocorteza. Por otra parte, cuerpos celulares de neuronas noradrenérgicas que están contenidos en el *Locus coeruleus* (LC), localizado en el piso lateral del cuarto ventrículo, inervan estructuras como: el tálamo, la amígdala, la neocorteza, el hipocampo y el cerebelo (Guzmán et al., 2022; James et al., 2020) (figura 3).

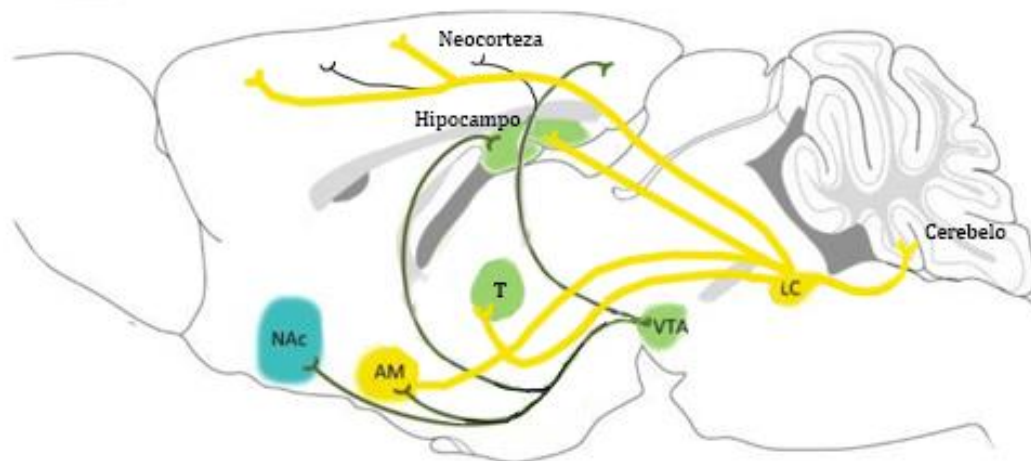


Figura 3. Vías catecolaminérgicas principales. Los cuerpos celulares de las neuronas catecolaminérgicas del Área Tegmental Ventral (VTA) proyectan sus axones a la amígdala (AM), al núcleo accumbens (NAc), al hipocampo y a la neocórtex. Los cuerpos celulares de neuronas catecolaminérgicas del *Locus coeruleus* (LC) proyectan a estructuras como: el tálamo (T), la amígdala, la neocórtex, el hipocampo y el cerebelo (Modificado de Flores et al., 2015).

Los cambios plásticos que favorecen los procesos de aprendizaje y memoria dependen en gran medida de la actividad catecolaminérgica. Debido a que las catecolaminas actúan como neuromoduladores, alterando la conectividad funcional por medio de la modificación de características neuronales intrínsecas y de la reconfiguración de la eficiencia sináptica (Guzmán et al., 2022).

Se ha observado que las neuronas catecolaminérgicas muestran degeneración desde etapas tempranas de la AD, y se ha comprobado que hay cambios durante la patología, tanto en el sistema noradrenérgico como en el dopaminérgico en las vías que inervan el hipocampo y la neocórtex. Además, en un modelo transgénico de AD, la progresión de la acumulación hipocámpal y cortical de βA está asociada con la reducción progresiva de la enzima TH, una enzima limitante de la tasa de síntesis de catecolaminas, en estas regiones (Liu et al., 2008). Así también se ha observado que la depleción cortical de catecolaminas en el modelo murino 3xTg-AD correlaciona con la acumulación local de βA y que un incremento de los niveles de DA y NA rescata la potenciación a largo plazo (LTP), así

como el desempeño en tareas de memoria (Moreno-Castilla et al., 2016). Varios estudios recientes han mostrado que una mejora en el sistema monoaminérgico puede restaurar la función cognitiva y promover la degradación de β A en modelos animales de neurodegeneración (Trillo et al., 2013).

El LC y el VTA son dos centros catecolaminérgicos importantes del circuito mesolímbico que se ven afectados durante la AD. Por ejemplo, la actividad disminuida del VTA se asocia con alteraciones de memoria en pacientes con AD (De Marco & Venneri, 2018). En la mayoría de los casos los primeros cambios patológicos visibles en secciones histológicas de agregados de tau ocurren en células de proyección del LC, se ha visto que cambios aberrantes en la proteína tau, identificados como una hiperfosforilación anormal, preceden a la formación de ovillos neurofibrilares en este núcleo, e incluso a la pérdida neuronal en otras estructuras, como la corteza entorrinal quien es de las primeras en degenerarse. Esta corteza juega un papel importante ya que por ejemplo en primates provee de una interface entre la neocorteza sensorial, la formación hipocampal y la neocorteza prefrontal (Heiko Braak & Del Tredici, 2015).

1.7 *Locus coeruleus*

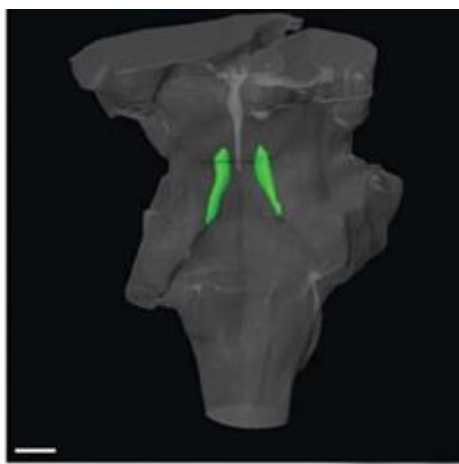
En el LC de pacientes con AD existe una pérdida neuronal significativa y una importante acumulación de ovillos neurofibrilares. Se ha establecido al LC como una de las pocas regiones cerebrales con una alta susceptibilidad para la degeneración neurofibrilar, debido a la presencia de ovillos neurofibrilares completamente formados y sus precursores, en etapas muy tempranas de la enfermedad. Se ha observado que la citopatología del LC es un evento temprano, el cual puede ser un factor mediador de la emergencia de cambios cognitivos que conducen a la demencia (Grudzien et al., 2007). La acumulación de material

patológico comienza muchos años antes de la aparición de los síntomas clínicos, lo cual resulta importante, ya que, si la citopatología del LC es parte de la cascada patogénica inicial y no un evento de fases avanzadas, lo vuelve un blanco potencial para terapias dirigidas a la prevención.

La neurodegeneración del LC es un proceso gradual, pacientes con deterioro amnésico cognitivo leve muestran una pérdida del 30% de células neuronales en el LC y en pacientes ya diagnosticados clínicamente con la enfermedad de Alzheimer, la pérdida neuronal del LC se incrementa aún más y se correlaciona con la disfunción cognitiva, lo que sugiere que la pérdida progresiva de neuronas en el LC es característica del proceso neurodegenerativo (Kelly et al., 2017). También se ha visto que la cantidad de ovillos neurofibrilares del LC correlaciona de forma negativa con la cognición global. En estudios *postmortem*, en los cuales se realiza la reconstrucción del tallo cerebral, se observa que el volumen del LC de pacientes con AD es mucho menor que el de sujetos sanos (Theofilas et al., 2017) (figura

4).

A



B

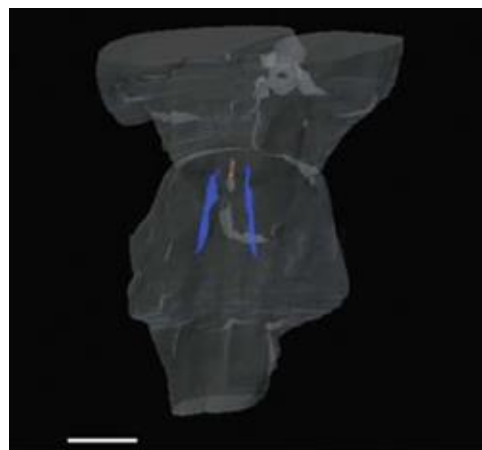


Figura 4. Reconstrucción del Locus Coeruleus. Reconstrucciones volumétricas del tallo cerebral (en gris) y del LC de: A) un sujeto sano (LC en verde) B) un paciente con AD (LC en azul). Nótese la atrofia marcada en B. Barras de Escala: 100 μm (Modificado de Theofilas et al., 2017).

Braak y Braak (1991) diseñaron un sistema universal de 7 puntos para la estadificación de la AD, en el que el patrón de distribución de ovillos neurofibrilares

permite la diferenciación de seis estadios, que correlacionan con la progresión del deterioro cognitivo, siendo el estadio 6 el de mayor grado de degeneración. Theofilas y colaboradores (2017) encontraron una correlación negativa entre el estadio de Braak y el tamaño del LC, es decir, a mayor grado de degeneración cerebral de acuerdo con esta escala, menor es el volumen total del LC observado en las reconstrucciones (figura 5). Cabe mencionar que los estadios de Braak comprenden muchos años de degeneración y, por lo tanto, este trabajo demuestra que se pueden notar los daños en el LC, es decir, la disminución medida en unidades de área del núcleo como tal muchos años antes de que comiencen los síntomas en los pacientes con AD. Se propone que aunque se ha dado mucha relevancia a la pérdida de neuronas de la corteza entorrinal, del hipocampo y del cerebro basal anterior, la degeneración del LC debería cobrar más importancia debido a que correlaciona mejor con las placas, los ovillos neurofibrilares, y los déficits cognitivos, que la muerte neuronal en otras áreas (Ross et al., 2015).

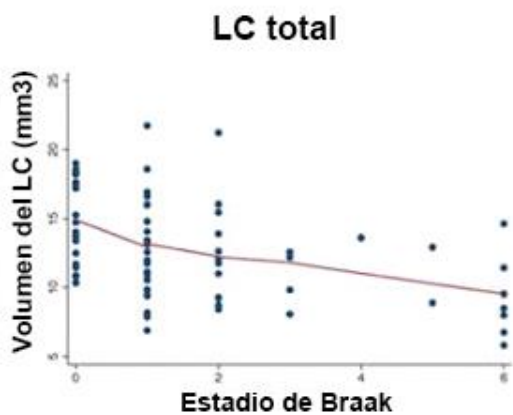
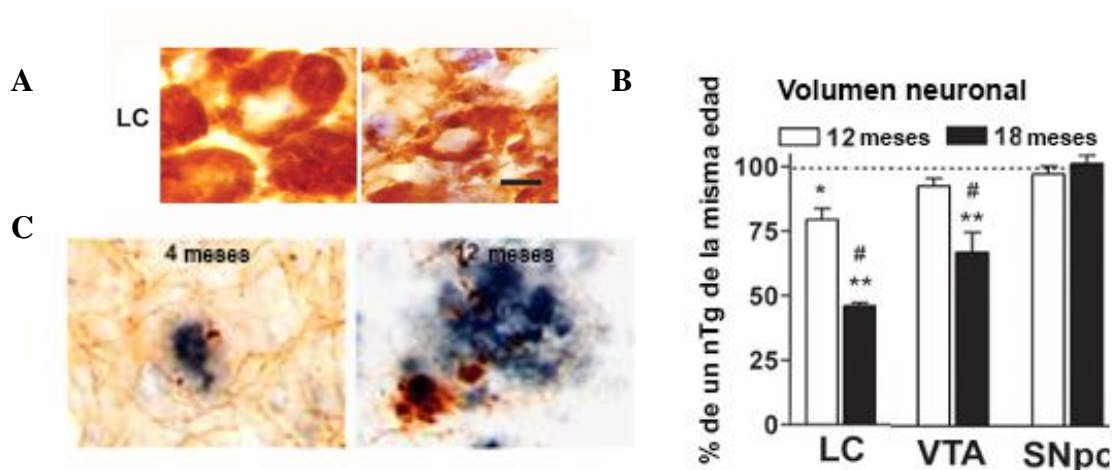


Figura 5. Correlación del tamaño del LC con el estadio de Braak. Gráfica que asocia el estadio de Braak y el volumen del LC (mm³). Los modelos de regresión lineal indican una correlación negativa entre el estadio de Braak y el volumen total del LC, con un estimado de pérdida de volumen de 8.4% por el incremento de un estadio de Braak (Modificado de Theofilas et al., 2017).

Por otro lado, en modelos animales, Lui y colaboradores (2008) demostraron que ratones transgénicos (tg) para la AD desarrollan depósitos de β -amiloide en el prosencéfalo de forma temprana, que, aunque no se observan éstos en el LC, existe una atrofia importante de los cuerpos neuronales en este núcleo, así como una marcada pérdida de terminales catecolaminérgicos en CA1, área que está fuertemente inervada por axones catecolaminérgicos del LC. Esto llevó a los autores a hipotetizar que quizás existe una degeneración retrógrada de los axones catecolaminérgicos de CA1 que finalmente lleve a una muerte neuronal en el LC. En su estudio, los autores muestran cómo hay un menor volumen neuronal en este núcleo catecolaminérgico y no en otros como en la *Substantia nigra pars compacta* (SNpc). Así también, se observa una disminución en el volumen neuronal del VTA. Sin embargo, esta disminución es más tardía, ya que se observan diferencias estadísticamente significativas hasta los 18 meses de edad y no a los 12 como se observan en el LC (Liu et al., 2008) (figura 6).



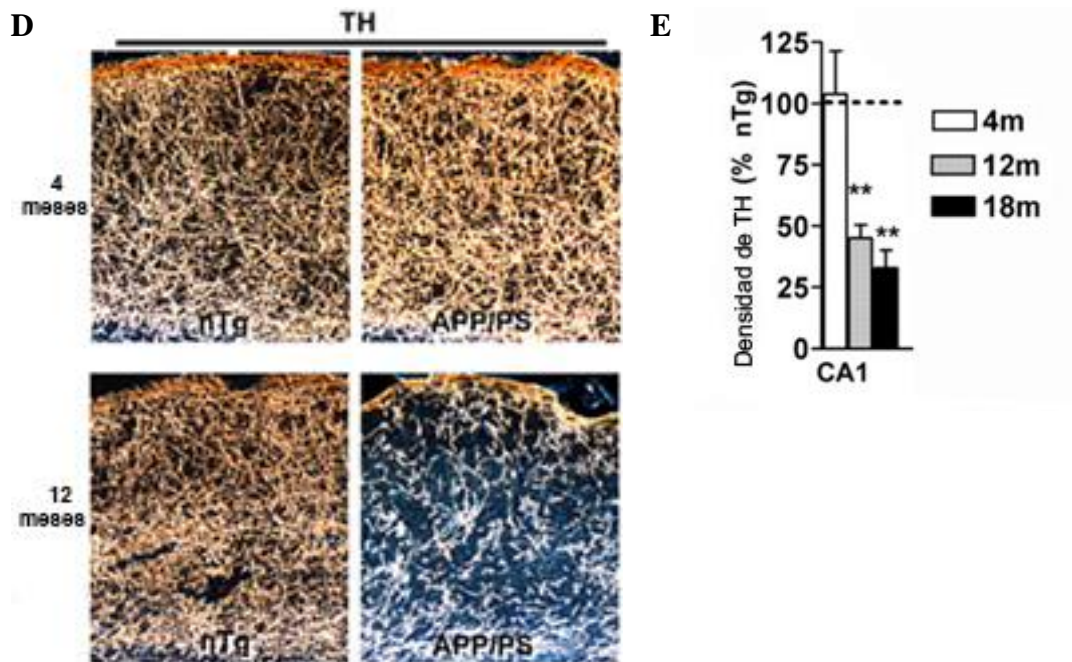


Figura 6. Degeneración catecolaminérgica en ratones transgénicos. A) Neuronas TH+ en el LC de ratones nTg y Tg de 18 meses de edad. Barra de escala 20 μ m. B) Neuronas catecolaminérgicas en el LC, el VTA y la SNpc (graficadas como porcentaje, siendo el 100% el número total de neuronas en los ratones nTg de la misma edad). C) Doble marcaje en corteza, de axones TH+ (café) y depósitos de β A (azul) en ratones Tg de 4 y 12 meses. D) Imágenes de campo oscuro de axones TH+ a los 4 meses de edad y a los 18 meses de edad, imágenes representativas de ratones no transgénicos (nTg) y Tg o aquí referidos como APP/PS E) Análisis cuantitativo de la densidad de axones TH+ en la región CA1 del hipocampo en animales Tg de 4, 12 y 18 meses expresada en porcentaje de cambio en comparación con la densidad de los animales nTg de la misma edad (Modificado de Theofilas et al., 2017).

Cabe resaltar que la liberación de DA y NA en el hipocampo (HPC) permite que memorias de corto plazo se consoliden en memorias de largo plazo. Dos vías importantes para este proceso son la vía VTA-HPC que permite la liberación de DA y la de LC-HPC que permite la liberación de DA y NA (Duszkiewicz et al., 2019; James et al., 2020) (figura 7).

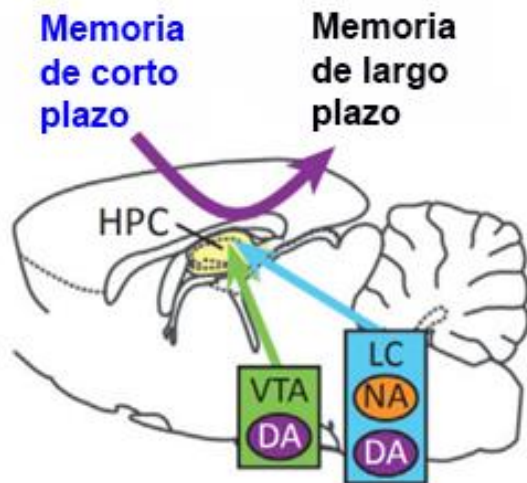


Figura 7. Vías catecolaminérgicas implicadas en la memoria. Dos vías importantes para la consolidación de memorias de corto largo plazo a memorias de largo plazo son la vía VTA-HPC que permite la liberación de DA y la de LC-HPC que permite la liberación de DA y NA (Modificado de Duszkiewicz et al., 2019).

Por lo tanto, probablemente en la AD, la sustancial degeneración de las neuronas del LC afecte la señalización de catecolaminas al hipocampo. Se plantea que una mejor comprensión de las consecuencias de la reducción de la entrada de DA y NA provenientes del LC al hipocampo puede permitir el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para la AD (James et al., 2020; Kelly et al., 2017). Además en modelos animales se ha visto que la inducción de la liberación de DA de terminales del LC hacia el hipocampo dorsal CA1 mejora el aprendizaje espacial a través de la actividad del receptor D1/D5 (Kempadoo et al., 2016).

1.8 Antecedentes

Estudios poblacionales sugieren que algunas experiencias de vida, como la educación, ocupaciones desafiantes, el ejercicio y la socialización pueden mejorar la reserva cognitiva aumentando la plasticidad sináptica y de esta forma proporcionar cierta protección contra el desarrollo de la AD (Nithianantharajah & Hannan, 2009; Then et al., 2015). En modelos

animales se ha utilizado la exposición a ambientes enriquecidos (EE) para imitar la estimulación cognitiva, social y física que los pacientes con AD pudieran tener. Se ha demostrado que un EE, revierte los déficits de memoria e incluso previene la acumulación de β A activando la microglía fagocítica en un modelo de ratón transgénico 5xFAD con inyecciones intra-hipocampales de β A (Ziegler-Walldkirch et al., 2018). En animales de tipo silvestre (WT) la exposición a un EE facilita la señalización que promueve la LTP en el hipocampo, demostrando que la exposición a EE aumenta la plasticidad sináptica hipocampal (Wei et al., 2020). Uno de los aspectos indispensables de los EE es la novedad y se ha demostrado en modelos murinos que la exposición repetida a la novedad aumenta la actividad catecolaminérgica, ejerciendo un efecto neuroprotector contra la toxicidad amiloide y esto, a su vez, permite una mejoría en el desempeño cognitivo en pruebas de memoria. Además, esta exposición repetida a objetos novedosos protege las fibras catecolaminérgicas de CA1 contra el daño causado por los oligómeros de β A (Velázquez, 2018).

Recientemente, se ha identificado que el mediador clave del beneficio consistente que se ha visto tras la exposición a EE es la señalización β -adrenérgica (Xu et al., 2018). Así también se ha demostrado que la exposición repetida a la novedad activa los receptores adrenérgicos β 2 y de esta manera previene la inhibición de la LTP, por oligómeros de β A solubles (Li et al., 2013). Esto resulta relevante para el presente trabajo ya que se ha demostrado que la exploración de la novedad causa un incremento de la actividad del LC e incrementa la liberación hipocampal de NA (Sara et al., 1994).

Siguiendo esta línea de pensamiento pareciera ser que el sistema catecolaminérgico está directamente relacionado con el efecto neuroprotector que ofrece la reserva cognitiva en la

AD (Robertson, 2013) sin embargo se desconoce qué vía catecolaminérgica específica es la que desencadena este efecto. Por lo tanto, en el presente estudio se propone estimular por medio de optogenética de forma repetitiva la vía catecolaminérgica del LC al hipocampo CA1, con el fin de determinar si la optoestimulación repetitiva de la vía pudiese tener un efecto neuroprotector que se refleje en la prevención de los déficits de memoria que presenta un modelo de AD. Se sabe de forma independiente que, tanto el hipocampo como el LC sufren una importante degeneración durante la AD. Así mismo, se ha demostrado que la administración de precursores catecolaminérgicos en el hipocampo, como en el LC pueden tener un efecto neuroprotector contra la AD (James et al., 2020; Kalinin et al., 2012; Kelly et al., 2017; Liu et al., 2015). Sin embargo, falta probar si la activación de la vía catecolaminérgica LC-CA1 puede también tener un efecto de protección reflejado en la conducta en un modelo de AD.

En modelos no patológicos se ha determinado la importancia de la vía LC-CA1, mostrando que es indispensable para la reconsolidación de la memoria de reconocimiento espacial. En un estudio realizado por Gálvez y colaboradores (2022) se evitó la reconsolidación de la memoria inhibiéndose con optogenética las terminales catecolaminérgicas en la región CA1 del hipocampo, provenientes del LC y no así con la inhibición de las terminales provenientes del VTA. Además, con microdiálisis in vivo se confirmó que la concentración extracelular tanto de DA como de NA disminuyó después de la optoinhibición de la vía LC-CA1 durante la sesión de reconsolidación en la tarea de localización de objeto. Esto permite concluir que las principales proyecciones catecolaminérgicas hacia el hipocampo para la modulación de la memoria de reconocimiento espacial provienen del LC.

Cabe mencionar que realizar estudios con optogenética tiene sus ventajas como desventajas. Esta técnica utiliza proteínas sensibles a la luz (opsinas) para controlar el flujo iónico y de esta manera permite activar o inhibir poblaciones neuronales, específica y diferencialmente con precisión de milisegundos (Herrera et al., 2014). La aproximación viral que se utiliza para esta metodología permite infectar a las neuronas de interés con una alta especificidad tanto genética como anatómica (Yizhar et al., 2011) y de esta forma permite manipular la actividad de neuronas de cierta identidad en una región específica del cerebro en animales *in vivo*. Una limitación de la técnica o más bien una característica a considerar, es que la optogenética es una aproximación metodológica para investigación y no una aproximación de intervención clínica, debido a que es una técnica invasiva. Además, una desventaja que no siempre se considera es que la implementación de la técnica puede por sí misma perturbar el sistema que se está investigando (Häusser, 2014).

Se han realizado estudios previos empleado la estimulación optogenética repetitiva en modelos de AD con diferentes objetivos. Por ejemplo, Wang y colaboradores (2019) estimularon neuronas glutamatérgicas en el giro dentado mediante un láser de 473 nm (1-3 ms, 10 Hz, 5 min) por seis días, en un modelo de AD inducido por la inyección intracerebral de oligómeros de β A42. Los ratones optoestimulados desplegaron memoria de trabajo (M1, medida 5 min después) y de corto plazo (M2, medida 2 h después) en una tarea de memoria de reconocimiento de objeto (ORM) a diferencia de los no estimulados quienes no mostraron tener memoria, ni de trabajo, ni de corto plazo. Sin embargo, estas optoestimulaciones no fueron suficientes para permitir la recuperación de la memoria a largo plazo (M3, LTM) ya que, ni los estimulados ni los controles mostraron memoria después de transcurridas 24 h (figura 8).

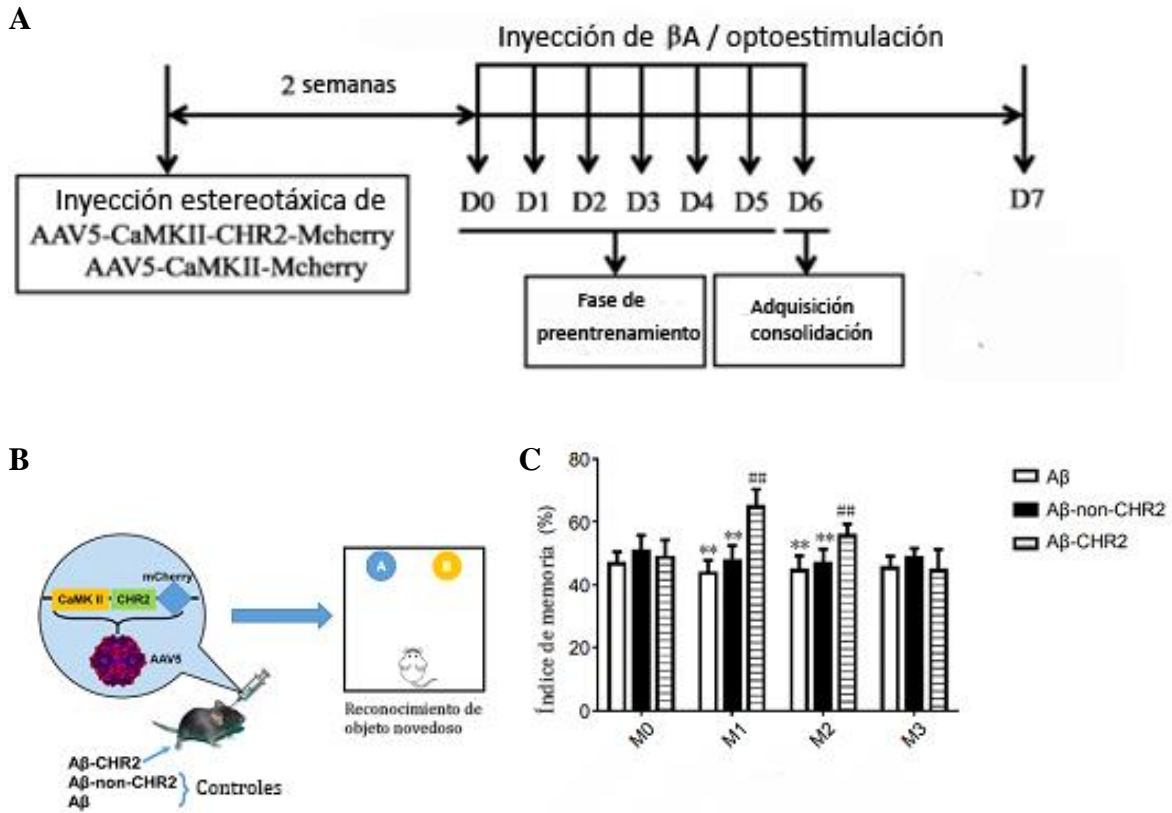


Figura 8. Optoactivación de neuronas glutamatérgicas en el giro dentado. A) Diagrama del protocolo experimental. Cirugía estereotáxica, para inyección de AAV con Chr2. Después de dos semanas se realizó la fase de pre-entrenamiento durante 5 días, durante los cuales se optoestimuló y se inyectó β A. El sexto día se realizó la adquisición y la consolidación de la memoria de reconocimiento de objeto, posteriormente se realizó una prueba de memoria, 5 min (M1, memoria de trabajo), 2 h (M2 memoria de corto plazo) o 24 h (M3 memoria de largo plazo) después de la adquisición. B) Esquema del AAV inyectado, el cual contiene el canal de rodopsina bajo el promotor de CaMKII y la proteína reportera roja (mCherry); el esquema de la tarea de ORM. C) Índice de memoria de la etapa de adquisición (M0) y de la consolidación M1, M2, M3, de los diferentes grupos: un grupo experimental con el canal de rodopsina Chr2 y la inyección de oligómeros de β A (barras rayadas), y dos grupos controles, uno con los oligómeros de β A sin Chr2 (barras negras) y otro sólo con los oligómeros de β A (barras blancas) (Modificado de Wang et al., 2019).

En este estudio, al igual que en la presente tesis, la técnica de optogenética se utilizó para estimular de forma repetitiva; sin embargo, en ese estudio se exploró otra vía de naturaleza glutamatérgica, por lo que se optoestimuló con diferentes parámetros de estimulación. En el presente trabajo se utilizó la técnica de optogenética para estimular la vía catecolaminérgica LC-CA1 con el fin de determinar su posible potencial como vía blanco en la prevención de los déficits de memoria en un modelo de AD. Para poder hacer

la estimulación específica de la vía, se inyectó un AAV con el gen ChR2 en el LC. Y se colocó una fibra óptica en la región CA1 del hipocampo. De esta manera únicamente se activarían las neuronas provenientes del LC, estimulando con luz las terminales catecolaminérgicas en CA1 (figura 9). Se evaluó la neurotransmisión de catecolaminas, así como también la liberación de otros neurotransmisores como glutamato (GLU) y GABA para ver si había un efecto generalizado o solo en la liberación de catecolaminas en animales TH-cre. Y posteriormente, se evaluó el efecto de las optoestimulaciones repetitivas de la vía en la memoria espacial de largo plazo en un modelo de AD.

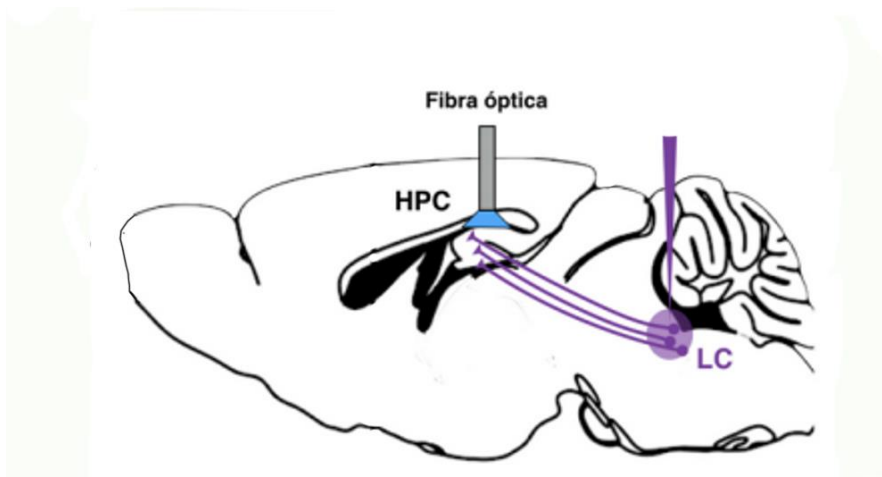


Figura 9. Vía estimulada. Se infectó el LC con un AAV que contenía el gen del canal de rodopsina sensible a la luz (ChR2). Y se colocó una fibra óptica en la región CA1 del hipocampo (HPC), para poder hacer la activación por medio de optogenética de la vía LC-CA1 (Modificado de Gálvez-Márquez et al., 2022).

2. Hipótesis

La estimulación repetitiva de las terminales catecolaminérgicas provenientes del *locus coeruleus* hacia la región CA1 del hipocampo, tendrá un efecto de prevención de los déficits de memoria en un modelo murino de la enfermedad de Alzheimer.

3. Objetivos

Objetivo General

Determinar el efecto de la estimulación optogenética repetitiva de las terminales catecolaminérgicas provenientes del *locus coeruleus* hacia el hipocampo, sobre la liberación de catecolaminas y la memoria espacial en un modelo murino de Alzheimer.

Objetivos particulares

1. Evaluar mediante microdiálisis *in vivo* el efecto de las estimulaciones repetitivas de vía catecolaminérgica LC-CA1, sobre la liberación de NA, DA, GABA y GLU en animales TH-Cre jóvenes (4 meses).
2. Evaluar el efecto de las estimulaciones repetitivas de la vía LC-CA1 sobre la memoria espacial de ratones viejos (10 a 12 meses) del modelo 4xAD-TH para la enfermedad de Alzheimer, mediante la tarea de localización de objeto y de laberinto acuático.

4. Metodología

4.1 Sujetos

En los primeros experimentos se buscó ver si las optoestimulaciones causaban algún cambio a nivel de neurotransmisión y de actividad motora en animales sin patología. Para lo cual se utilizaron 16 ratones transgénicos TH-Cre heterocigotos de la cepa C57BL/6 de 4 meses de edad. Los ratones reproductores TH-Cre fueron donados el Dr. Fatuel Tecuapetla obtenidos del laboratorio del Dr. Rui M. Costa del Center for the Unknown Champalimaud, Portugal y cruzados con ratones C57BL/6J durante al menos seis generaciones.

Para los experimentos conductuales se utilizaron 11 ratones 4xAD-TH de 11 a 12 meses, edad en la que presentan niveles significativos de los marcadores de la AD así como de deterioro cognitivo, los cuales constituyen un modelo de AD ya estandarizado (López,

2021). Este genotipo se logró mediante la cruce de ratones homocigotos 3xTgAD (Psen1/APP/tau) (obtenidos del laboratorio de Frank LaFerla, University of California, Irvine) con ratones TH-Cre heterocigotos (para un mejor resumen de los grupos ver figura 14).

Todos los ratones fueron alojados individualmente en cajas de acrílico transparente (29.5 cm de largo, 18.5 cm de ancho y 12.5 cm de alto) con aserrín que se cambió 3 veces a la semana, en el *vivarium* del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, con un ciclo luz/obscuridad de 12h/12h, hora de encendido 6 a.m., 22°C de temperatura y humedad de 50%. Se les mantuvo con una dieta de alimento (lab diet 5001) y agua *ad libitum*. Todos los experimentos cumplieron los lineamientos del reglamento del comité para el cuidado y uso de animales del Instituto de Fisiología Celular, UNAM (FBR125-18) el cual establece el cumplimiento de la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999) acerca de las “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio” (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación; 2001).

La experimentadora recibió capacitación teórica y práctica en: “Taller de manejo y uso de roedores de laboratorio” que se acreditó el 1 de febrero del 2018, por el bioterio del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

4.2 Genotipificación

Para determinar qué ratones expresaban el transgen “Cre” se realizó una genotipificación por medio de una reacción en cadena de la polimerasa punto final (PCR). Como solo se buscaba ver si los ratones expresaban el transgen no fue necesario cuantificar el DNA extraído. La extracción de DNA se realizó cortando 1 cm de tejido de las colas de

los ratones. El tejido fue macerado mecánicamente y se agregaron 50 μ l de una solución de lisis alcalina (250 μ L de NaOH 10 N + 40 μ l de EDTA 0.5 M; 100 ml de H₂O). Las muestras se incubaron a 95°C durante 60 min y después se les añadieron 50 μ l de una solución de neutralización (Tris-HCl 40 Mm; 100 ml de H₂O). Todas las muestras fueron centrifugadas a 12500 rpm durante 2 min a 22 °C para separar el residuo sólido. Se recuperó el sobrenadante y se conservó a – 4 °C . A continuación, se dio paso a realizar la PCR punto final, para lo cual se agregó al DNA extraído de cada muestra, la mezcla de los siguientes reactivos:

	Volúmenes por muestra
Agua	12.07 μ l
Buffer 10 x	2.0 μ l
dNTPs	0.5 μ l
cebador Cre FWD 10 mM	1.0 μ l
cebador Cre REV 10 mM	1.0 μ l
Cloruro de Magnesio (Mg Cl ₂)	1.33 μ l
Taq polimerasa	0.1 μ l
DNA	2 μ l

La secuencia de los cebadores utilizados fue la siguiente:

Cre REV 5' GGTTTCCCGCAGAACCTGAA

Cre FWD 5' AGCCTGTTTTGCACGTTACACC

Posteriormente las muestras se colocaron en el termociclador, el cual fue programado de la siguiente manera:

Inicio: 94°C por 5 min. Este paso solo es necesario para DNA polimerasas que requieren activación por calor.

Amplificación: los siguientes cambios de temperatura se realizaron por 35 ciclos.

- Desnaturalización: 94°C por 30 segundos. Aquí se separan o desnaturalizan las dos cadenas complementarias del DNA blanco.
- Alineamiento: 55 °C por 30 segundos. Consiste en el apareamiento específico entre los fragmentos iniciadores (oligonucleótidos) y las cadenas simples del DNA desnaturalizado.
- Extensión: 72 °C por 1 min. En este paso la DNA polimerasa extiende la longitud de los fragmentos iniciadores que se encuentran unidos al DNA blanco, originando nuevas cadenas complementarias a las dos cadenas sencillas del DNA desnaturalizado presente al inicio de la reacción.

Al terminar los 35 ciclos

- Elongación final: 72 °C por 3 min. Se asegura que cualquier cadena simple DNA restante sea totalmente amplificada.
- Conservación: 4 °C por un tiempo indefinido para conservar la reacción a corto plazo.

Finalmente, las muestras se corrieron en un gel de agarosa al 2%, el cual fue preparado agregando 0.8 g de agarosa a 40 ml de TAE (Tris-base 0.039M; ácido acético 0.015M; EDTA0.01M; pH 7.4). El gel fue teñido con bromuro de etidio (2 µl) para marcar los sitios de presencia de DNA.

A las muestras que salieron del termociclador se les agregó el buffer de carga (50% de glicerol, 0.25 % de azul de bromofenol, 0.25% de cianol de xileno en buffer de muestra

10x QUIAGEN) para observar el corrimiento en el gel. Se cargaron 10 μ L de cada muestra por carril del gel y fueron corridas en una solución amortiguadora TAE (Tris-base 0.039M; ácido acético 0.015M; EDTA0.01M; pH 7.4) a 70 V durante 50 min. Los geles se revelaron con luz ultravioleta y se tomaron las fotografías pertinentes con el fin de determinar que muestras mostraban la banda correspondiente a CRE + (figura 10).

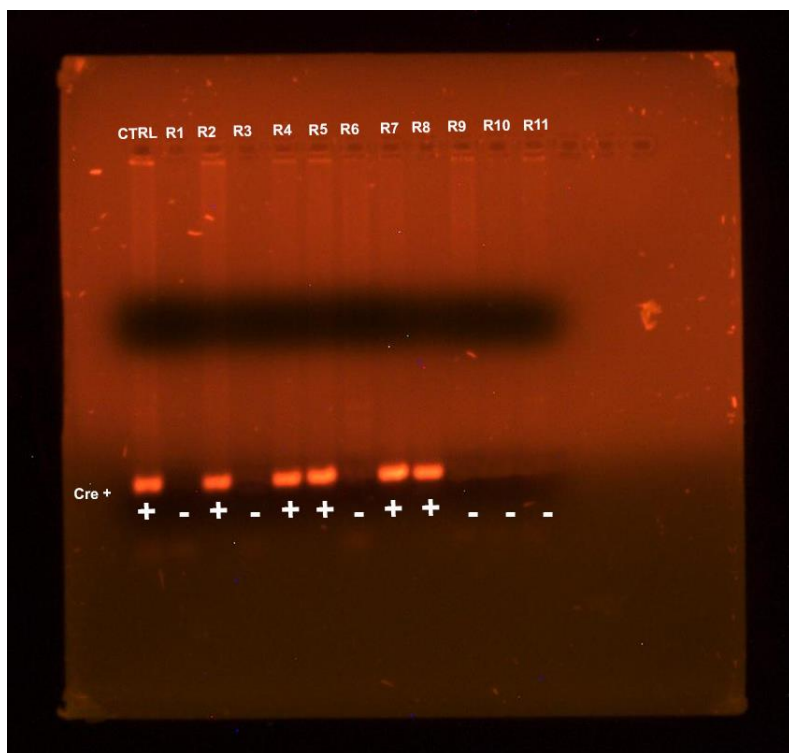


Figura 10. Bandas observadas en el gel. Se observa una banda en el corrimiento de las muestras de los ratones con el transgén de Cre +, en el revelado del gel. En este caso los ratones R2, R4, R5, R7 y R8 son ratones con el transgén Cre +.

4.3 Cirugía estereotáxica

Con el objeto de poder estimular la vía LC-CA1 por medio de optogenética se realizó una cirugía estereotáxica en donde se infectó el LC con un AAV y se colocaron las cánulas con la fibra óptica en la región CA1 del hipocampo.

Para la inyección del AAV:

Dependiendo del grupo al que hubiera sido asignado el ratón se administró:

-Grupo control: vector viral Cre-inducible AAV obtenido de Vector Biolabs con una concentración viral de 4.0×10^{12} partículas por ml, AAV5/EF1a-DIO-EYFP.

-Grupo experimental: vector viral Cre-inducible AAV obtenido de Vector Biolabs con una concentración viral de 4.0×10^{12} partículas por ml, AAV5/EF1a-DIO-hChR2(H134R)-EYFP.

Ambos vectores fueron almacenados en alícuotas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso. Los ratones fueron montados en el aparato estereotáxico, se les indujo anestesia con isoflurano 2 % (inducción) y se mantuvo con isoflurano al 1-2% con flujo constante de oxígeno a 1 l/min. Para iniciar la cirugía se realizó una incisión en la línea media de la cabeza para exponer el cráneo del animal. Las coordenadas con respecto a bregma fueron registradas y usadas como referencia para posteriormente localizar las regiones de interés. Se utilizó una jeringa Hamilton conectada a un inyector vía una tubería de polietileno para inyectar el AAV en el *Locus coeruleus* (AP: -5.5 mm ; ML: $\pm 0.90\text{ mm}$; DV: -3.3 mm). Se inyectaron $0.5\text{ }\mu\text{L}$ de virus por hemisferio por animal a una tasa de $0.25\text{ }\mu\text{l/min}$, controlado por una bomba de microinfusión. Después de la infusión, el inyector se dejó en el lugar de infección por 3 minutos para permitir la difusión.

Para la implantación de férulas:

Se colocaron férulas de fibra óptica (apertura numérica 0.22, $200\text{ }\mu\text{m}$ de diámetro; Doric Lenses) en el área CA1 del hipocampo dorsal (AP, -2.40 mm ; ML $\pm 2.0\text{ mm}$; DV, -1.00 mm) de los ratones.

Para la implantación de la cánula de microdiálisis:

Se implantó una cánula guía de microdiálisis (CMA/7; CMA Microdialysis; Kista, Suecia), dirigida a la región CA1 del hipocampo con un ángulo frontal de 25° AP (AP, -3.0 mm ; ML $+2.0\text{ mm}$; DV, -1.5 mm).

4.4 Estimulación optogenética

Se estimuló con un láser DPSS (de estado sólido bombeado por diodos) con una luz azul de longitud de onda de 473 nm, la frecuencia de estimulación fue de 20 Hz con pulsos de 1 segundo de duración, un pulso cada 5 segundos. La potencia de los cables utilizada fue de 10 a 15 mW. Se estimuló por 10 min, durante 8 días. Se videograbaron las sesiones de optoestimulación con cámaras digitales HD modelo c270 (Logitech, California U.S.A.) para su posterior análisis.

4.5 Microdiálisis en libre movimiento

Después de realizar las optoestimulaciones repetitivas, se procedió a realizar la microdiálisis en libre movimiento con una sonda de microdiálisis CMA/7 (CMA Microdialysis; Kista, Suecia) permitiendo la entrada de solución fisiológica Ringer (solución de MgCl₂ 12mM, NaCl 1.44 M, CaCl₂ 17 mM y KCl 48 mM) a un flujo de 0.25 µl/min con la bomba de inyección continua (100 pump CMA Microdialysis; Kista, Suecia), para coleccionar los neurotransmisores por difusión de la membrana semi permeable de cuprofano de 2 mm. Se recolectaron pequeñas muestras de líquido extracelular durante 5 fracciones correspondientes a 16 min, con ayuda del sistema de tubería EICOM Concise Freely Moving System (EICOM, San Diego); cada fracción fue colocada en un vial con 1 µl de mezcla antioxidante (ácido ascórbico 25 mM, Na₂EDTA 27 mM y ácido acético 1 M).

Posteriormente, se procesaron las muestras obtenidas. Para lo cual se realizó el tratamiento químico para la detección de los neurotransmisores en el equipo EC-LIF, el cual consistió en la adición del compuesto FQ ([3-(2-furoil) quinolina-2-carboxialdehído] (16.67 mM) (Molecular Probes; Invitrogen, Carlsbad, E.E.U.U.) a la muestra. El FQ

reacciona específicamente con aminas primarias para formar conjugados altamente fluorescentes que son excitables por el láser. Esta reacción es catalizada por cianuro de potasio (24.5 mM) disuelto en amortiguador de boratos (10 mM) incubándose a 65°C durante 15 min. Adicionalmente, se agregó como estándar interno 1 µl de aminoácido O-metil-L-treonina 0.0736 mM (Fluka, St. Louis, E.E.U.U.) para utilizarlo como compuesto de referencia.

Las muestras de microdiálisis fueron procesadas a través de la técnica de electroforesis capilar con detección por fluorescencia inducida por láser (EC-LIF), donde se determinó la presencia de DA, NA. A manera de control se determinó también la presencia de GABA y GLU, con el objetivo de ver si la estimulación repetitiva de la vía LC-CA1 causaba un cambio en la neurotransmisión en general o solo a nivel de catecolaminas. Posteriormente, se procesaron las muestras en el equipo de electroforesis capilar P/ACE MDQ (Beckman Coulter; Pasadena, E.E.U.U). Las muestras fueron inyectadas a un capilar y se corrieron en amortiguador de separación (boratos 24.85 mM, dodecilsulfato sódico (SDS) 35.71 mM, β-ciclodextrina 4.99 mM, urea 10 M y metanol 14.7%; pH: 9.2) a un voltaje de 23 kV. Este amortiguador permite la separación de moléculas de carga neutra por migración diferencial por el principio de flujo electro-osmótico permitiendo la detección de fluorescencia por detector LIF a 488 nm. Finalmente, la señal se tradujo en picos que forman electroferogramas con el software 32 Karat TM 8.0 (Beckman Coulter; Pasadena, E.E.U.U.). La cuantificación de neurotransmisores se realizó midiendo el área bajo la curva de los picos correspondientes a DA, NA, GABA y GLU y se corrigió respecto al volumen que se obtuvo de cada muestra y respecto al área bajo la curva del compuesto de referencia (O-metil-L-treonina) (figura 11).

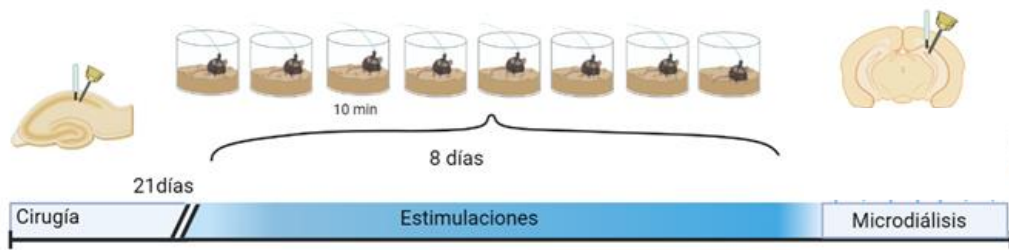


Figura 11. Protocolo experimental microdiálisis. Para el protocolo experimental de microdiálisis in vivo, se realizó la cirugía estereotáxica en donde se colocó la fibra óptica y la cánula guía de microdiálisis; después de 21 se realizaron optoestimulaciones diarias de 10 min por 8 días y posteriormente se tomaron las muestras de microdiálisis.

4.6 Memoria de localización de objeto

La prueba de memoria de localización de objeto (OLM) es una tarea que depende de hipocampo y es utilizada para evaluar la memoria espacial de los sujetos (Denninger et al., 2018). El protocolo de OLM que se utilizó estuvo compuesto por 3 fases: optoestimulaciones, adquisición (ADQ) y memoria a largo plazo (LTM). La primera fase fue de 8 días y consistió en estimular a los sujetos por 10 min en cajas (contexto) cuadradas de madera de 33 x 30 cm con el piso cubierto con una capa de aserrín y una clave contextual en la pared de la caja a 2 cm del piso, esta clave fue de 4 x 28 cm y consistió en rayas verticales negras pintadas sobre un fondo blanco (cada raya con una medida de 1.5 cm de ancho). En el día 7 y 8 se llevó a cabo la segunda fase, denominada adquisición, en la que los ratones fueron expuestos a la misma caja contexto solo que ahora se introdujeron en la caja dos objetos diferentes (figuras construidas a partir de bloques de Lego) que el ratón nunca ha visto. A cada sujeto se le dieron 10 min para explorar la caja con los objetos nuevos colocados en posiciones específicas. Con la finalidad de reducir sesgos debidos a la preferencia por algún objeto, se balanceó la elección de éstos y sus ubicaciones. Las adquisiciones fueron realizadas por las tardes para que las optoestimulaciones no interfirieran con ellas (las optoestimulaciones se realizaron en las mañanas). Finalmente, en

el día 9 se pasó a la última fase, denominada memoria a largo plazo (LTM), en la que se introdujo a los animales a la misma caja contexto solo que ahora uno de los objetos fue cambiado a una posición novedosa, y al igual que en las fases anteriores se dejó al sujeto explorar por 10 min (figura 12). Para el análisis de los datos se utilizó un índice de reconocimiento expresado como la cantidad de tiempo que pasa un sujeto explorando un objeto entre el tiempo total que pasa explorando los dos objetos (tiempo explorando el objeto x / (tiempo explorando el objeto X + tiempo explorando el objeto Y)). Un índice de reconocimiento (IR) de 0.5 indica que no hay preferencia por ninguno de los dos objetos y corresponde al azar, mientras que un índice de reconocimiento significativamente más alto que 0.5 demuestra preferencia por alguno.

La fórmula que se utilizó para sacar el índice de reconocimiento fue la siguiente:

$$\text{índice de reconocimiento (IR)} = \frac{\text{tiempo explorando un objeto (s)}}{\text{tiempo total de exploración (s)}}$$

$$\text{tiempo total de exploración} = \text{tiempo explorando los dos objetos (s)}$$

Durante la LTM los objetos fueron denominados: F (el de posición familiar) y N (el de posición novedosa). El índice de reconocimiento fue determinado para cada uno de ellos. La ADQ y la LTM fueron videograbadas con cámaras digitales HD modelo c270 (Logitech, California U.S.A.) para su posterior análisis.

Debido a que los ratones tienen una preferencia innata por la novedad un IR que demuestre preferencia por el objeto en posición novedosa es un indicador de que tienen memoria, es decir, que recuerdan su anterior localización (Denninger et al., 2018).

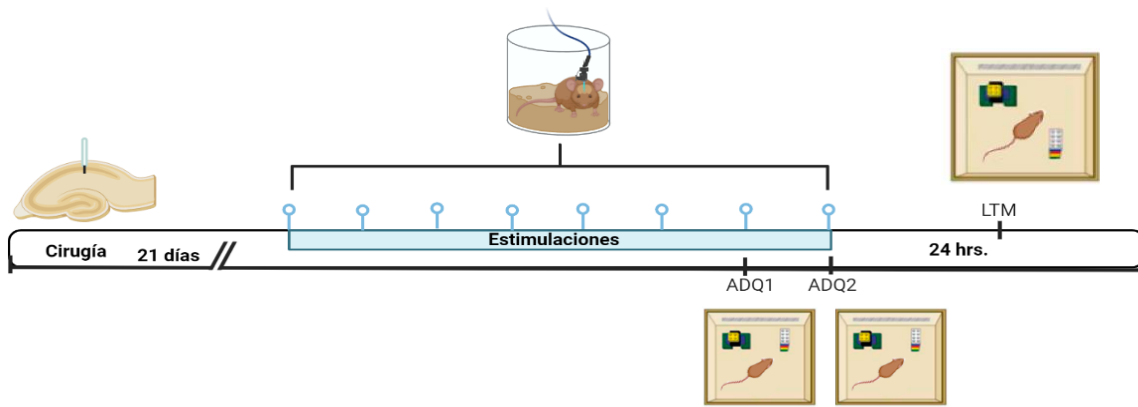


Figura 12. Protocolo para la tarea de memoria de localización de objetos (OLM). Se llevó a cabo la cirugía estereotáxica y 21 días después se realizaron las optoestimulaciones repetitivas. En el séptimo día se llevó a cabo la adquisición 1 (ADQ1) durante la cual se presentan 2 objetos en posiciones específicas. Al siguiente día en una segunda adquisición (ADQ2) se presentaron los mismos objetos en las mismas posiciones. Finalmente 24 h después se llevó a cabo la prueba de memoria de largo plazo (LTM) en la que uno de los objetos se desplazó a una ubicación novedosa.

4.7 Laberinto acuático (MW)

Una de las tareas más utilizada para evaluar la memoria espacial dependiente de hipocampo en los modelos animales es el MW (Savage & Ma, 2014), en el cual los sujetos deben encontrar una plataforma sumergida en una tina de agua mediante claves espaciales. El protocolo de entrenamiento del MW fue de cuatro días de entrenamiento separados por 24 h cada uno y una prueba de memoria a largo plazo, 48 h después de finalizado el cuarto día de entrenamiento. Cada entrenamiento constó de cuatro ensayos en los que se permitió al ratón nadar en una tina (circular de 110 cm de diámetro y 64.4 de alto; con claves contextuales en las paredes que consistían en un círculo y un cuadrado) con agua a 20 °C. Se agregó pintura blanca, para evitar que los ratones vieran la plataforma. En estos ensayos se dejó explorar al ratón desde diferentes posiciones iniciales, con la finalidad de que encontrara la plataforma (blanca de 13.2 x 13.2 cm) sumergida y aprendiera su localización. Se midió el tiempo de latencia que tarda el sujeto en llegar desde cada posición a la

plataforma, que no debe pasar de 60 segundos; si el ratón no es capaz de llegar a la plataforma por sí solo en este tiempo es gentilmente dirigido a ella y colocado allí por 10 segundos. Durante la prueba de memoria a largo plazo se retiró la plataforma y se dejó nadar al sujeto por 1 min. El ratón se colocó desde la posición más lejana a donde antes que se encontraba la plataforma. Al igual que en la tarea OLM la prueba de memoria a largo plazo fue videograbada con cámaras digitales HD modelo c270 (Logitech, California, U.S.A) para su posterior análisis.

Esta tarea se implementó después de concluido el protocolo de OLM para seguir explorando la memoria espacial tras transcurrido un tiempo después de las optoestimulaciones (figura 13). En esta prueba se evaluó memoria a largo plazo y los parámetros medidos fueron: tiempo en el cuadrante blanco, número de cruces y latencia de llegada al lugar previo de ubicación de la plataforma.

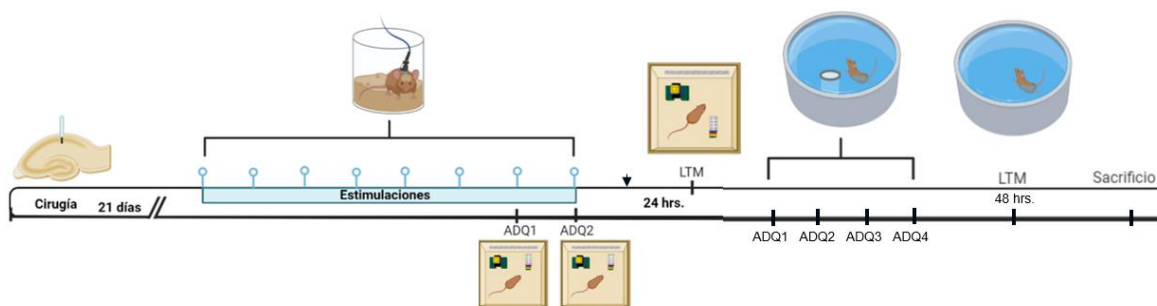


Figura 13. Laberinto acuático de Morris. Se realizó la cirugía estereotáxica, se dejaron pasar 21 días y se realizaron las optoestimulaciones, se llevó a cabo la tarea de OLM y 24 h después se dieron 4 días de entrenamiento (ADQ1, ADQ2, ADQ3, ADQ4) en la tarea de laberinto acuático (MW). Una vez terminados los entrenamientos se dejaron pasar 48 hrs y se dio paso a la prueba de memoria a largo plazo (LTM). Finalmente, un día después los sujetos fueron sacrificados.

4.8 Inmunohistoquímica

Al terminar los anteriores protocolos, los sujetos fueron sacrificados con pentobarbital sódico inyectado de forma intraperitoneal a una dosis de 75 mg/kg y perfundidos con solución salina isotónica (SSI) al 0.9% y paraformaldehído (PFA) al 4%. Se extrajeron los cerebros y se fijaron en PFA 4% durante 3 días. Posteriormente, se pasaron a sacarosa al 30% y después de 2 días almacenados a -4 °C se realizaron cortes coronales de 40 µm del LC y de CA1, en un criostato (Leica CM1520) a una temperatura de -20 °C. Posteriormente estos cortes fueron lavados con solución de buffer trizma (TBS) 3 veces y con TBS + Tritón 0.1% (TBS-T) una vez, cada lavado duró 10 min en agitación.

Se incubaron los tejidos con el anticuerpo primario Anti-TH (PeelFreez), host rabbit (1:1000), durante 24 h a 4°C en agitación. El anticuerpo se preparó en TBS con *albúmina* de suero bovino al 5% (TBS-BSA). Al siguiente día se realizaron 6 lavados de 10 min cada uno con TBS en agitación y después se incubó con el anticuerpo secundario Goat anti-rabbit Cy3 (1:250) durante 90 min en obscuridad y agitación a temperatura ambiente. El anticuerpo se preparó en TBS-BSA al 5%. Posteriormente, se realizaron otros 3 lavados con TBS de 10 min cada uno y se hizo la tinción con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) 300 nM durante 3 min. Este compuesto es un marcador fluorescente que se une fuertemente a regiones enriquecidas en adenina y timina en secuencias de DNA, por lo que se utilizó para marcar núcleos. Se montaron los cortes en laminillas salinizadas con medio de montaje para fluorescencia (Dako, S3023). Se observó la inmunofluorescencia usando un microscopio confocal LSM800.

4.9 Análisis estadísticos

Se realizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov para verificar que los datos se distribuyeron de forma normal. Y la prueba de Levene para comprobar que los datos tuvieron homogeneidad de varianzas. Cuando la distribución de los datos fue normal pero no hubo homoscedasticidad, se utilizaron pruebas *t* de “*Student*” con corrección de Welch. Los datos con distribución no paramétrica se analizaron con la prueba U de Mann-Whitney.

Las diferencias se consideraron significativas cuando la $p < 0.05$. Se usó el programa GraphPad Prism para realizar los análisis estadísticos y para la presentación gráfica de los datos.

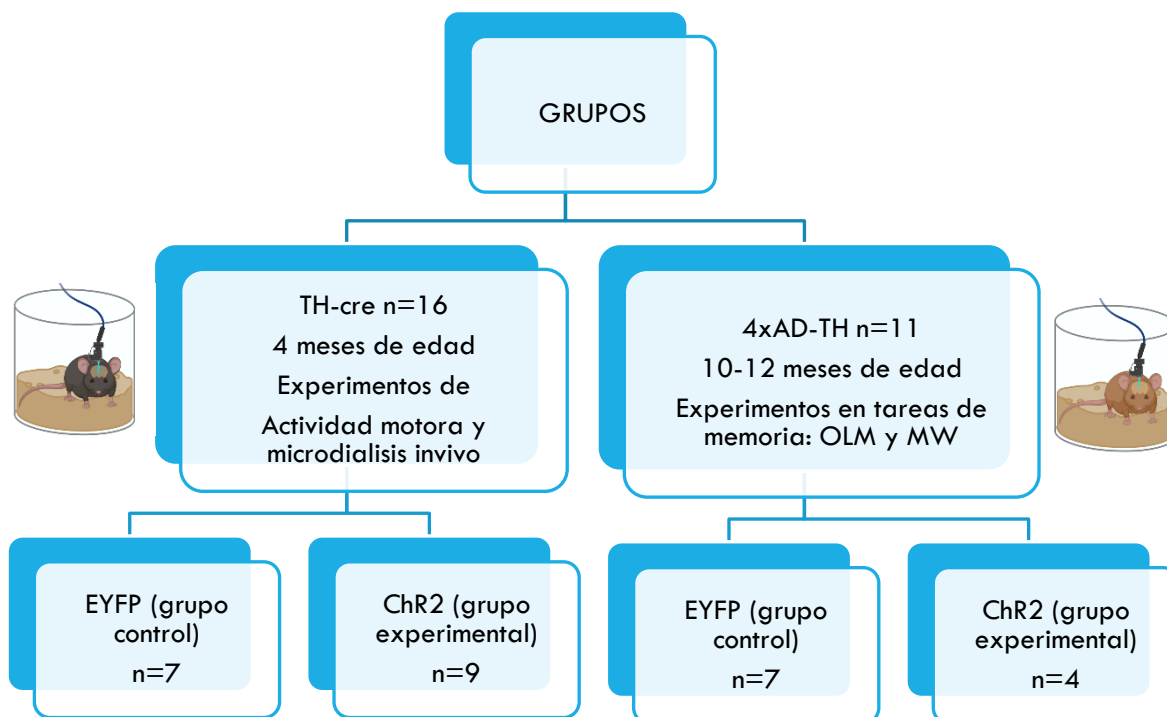


Figura 14. Descripción de los grupos empleados. TH-cre ratones transgénicos heterocigotos de la cepa C57BL/6 de 4 meses de edad. Empleados para los experimentos de actividad motora y microdialisis *in vivo*. 4xAD-TH modelo logrado mediante la cruce de ratones 3xTgAD homocigotos con ratones TH-cre heterocigotos de la cepa C57BL/6. Modelo utilizado para los experimentos de tareas conductuales de memoria de localización de objeto (OLM) y de laberinto acuático (MW). Los ratones de los grupos control

expresaron únicamente la proteína reportera (EYFP). Mientras que los ratones de los grupos experimentales expresaron el canal catiónico sensible a luz (ChR2).

5. Resultados

5.1 Infección de los somas de neuronas catecolaminérgicas en el LC

Con el objetivo de analizar la precisión de la infección en las neuronas catecolaminérgicas en todos los grupos, se realizó la detección con inmunohistoquímica de la enzima tirosina hidroxilasa (TH) en cortes coronales del LC. Utilizando un microscopio confocal se observó que la señal de la enzima TH (en rojo) colocalizó con la proteína reportera EYFP (en verde) en los somas, cuyos núcleos fueron marcados con DAPI (en azul) del LC. Aunque no hubo una colocalización del 100%, el porcentaje de área de colocalización fue mayor al 60% lo que permite concluir que las neuronas catecolaminérgicas del LC fueron correctamente infectadas (figura 15).

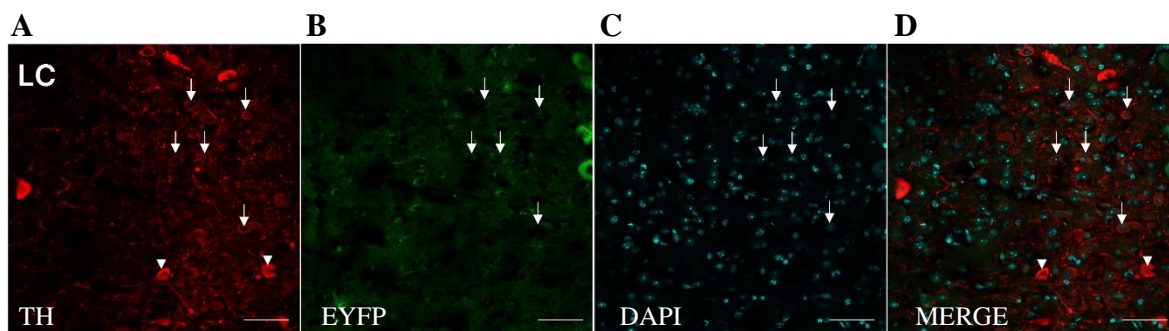


Figura 15. Infección de los somas de neuronas catecolaminérgicas del LC. Se muestran imágenes representativas del LC: A) La marca de la inmunohistoquímica contra la enzima tirosina hidroxilasa (TH); B) La proteína mejorada amarilla fluorescente (EYFP) que marca las neuronas infectadas con el AAV; C) Los núcleos teñidos con DAPI (azul); D) La colocalización (MERGE) de las neuronas que expresan EYFP, TH y DAPI. La barra blanca de escala representa 100 μ m. Las flechas muestran algunas de las neuronas que tienen las tres marcas EYFP, TH y DAPI. Y las puntas de flechas ejemplan neuronas que no colocalizan.

Además, se corroboró la infección y colocalización de las terminales catecolaminérgicas en la región CA1 del hipocampo, la cual fue observada con microscopía confocal en todos los grupos (figura 16).

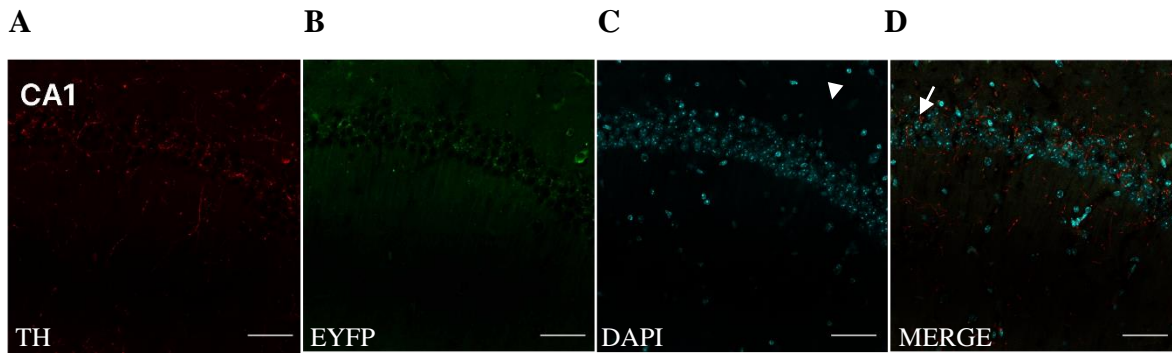


Figura 16. Terminales catecolaminérgicas en CA1. Se muestran imágenes representativas de CA1: A) La marca de la inmunohistoquímica contra la enzima tirosina hidroxilasa (TH); B) La proteína mejorada amarilla fluorescente (EYFP) que marca las terminales infectadas con el AAV; C) Los núcleos teñidos con DAPI (azul); D) La colocalización (MERGE) de EYFP, TH y DAPI. La barra blanca de escala representa 100 μm .

5.2 La actividad motora aumenta durante la estimulación

Con el objetivo de cuantificar la actividad motora de los animales, se videograbaron las sesiones de estimulación y se analizaron los videos con el complemento de rastreador de animales del programa ImageJ. Se analizó la sesión 8 para observar la actividad motora de los animales durante la optoestimulación una vez que los ratones ya se habían habituado al contexto y a dicho procedimiento. Se encontró que los animales del grupo experimental ChR2 tuvieron mayor actividad motora, en comparación con los del grupo control EYFP. Lo cual se graficó tanto en distancia recorrida, como en velocidad. Para comparar los grupos se usó una t de “*Student*” debido a que los datos se distribuyeron de forma normal. Además, se muestran imágenes representativas del trazo de rastreo de sujetos de los dos grupos durante la sesión 8 de estimulación, en las que se observa que los ratones con el canal de rodopsina sensible a la luz CHR2 se mueven más (figura 17).

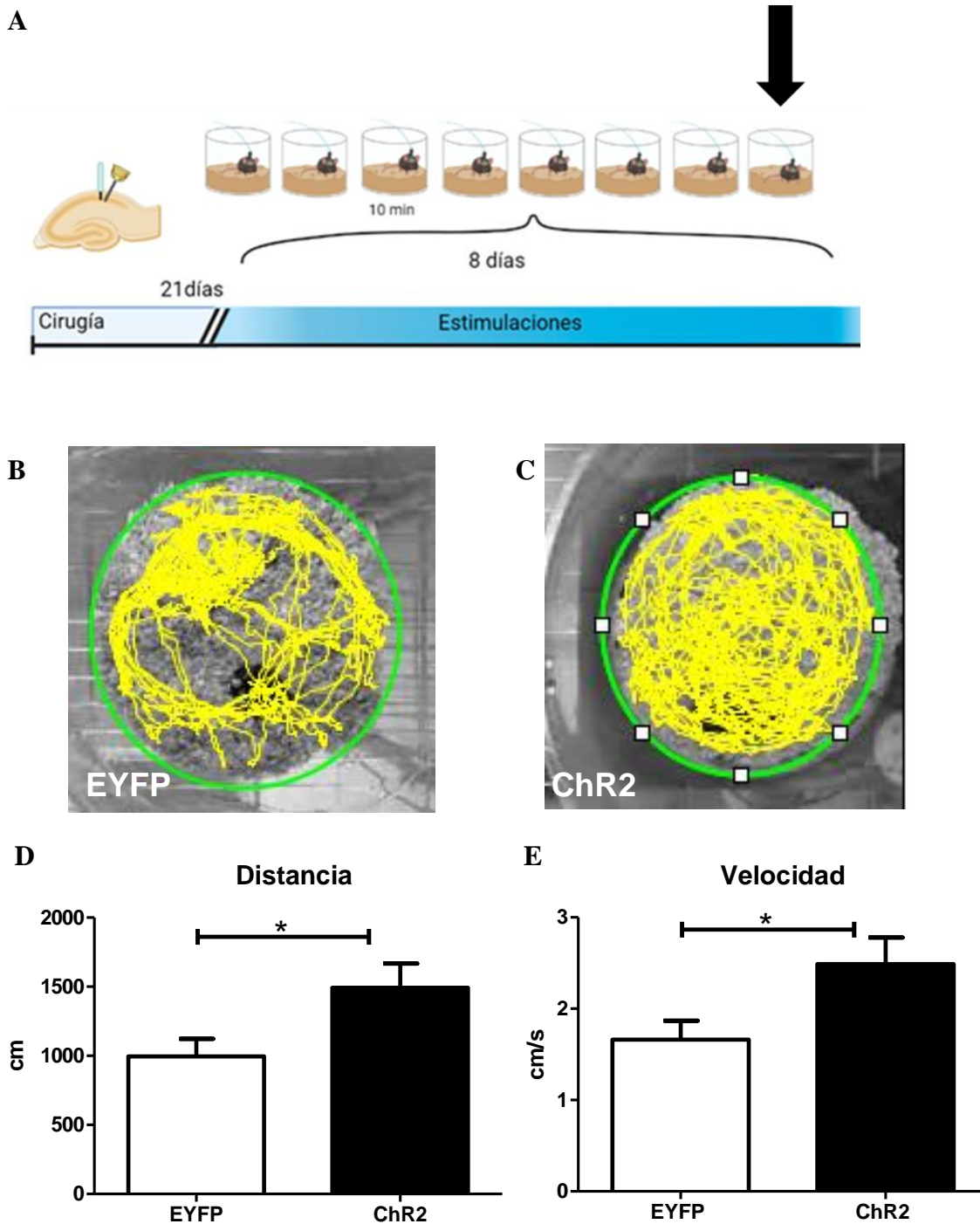
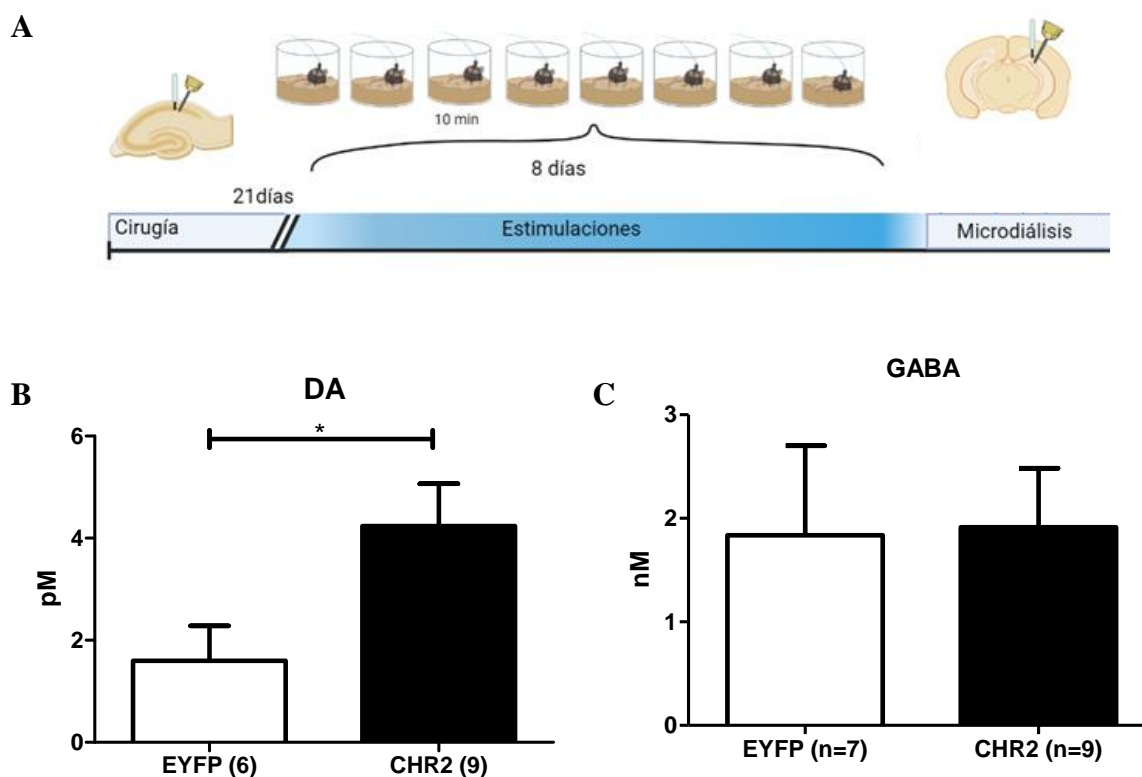


Figura 17. Actividad motora aumenta durante la optoestimulación. A) Diagrama del protocolo experimental, se realizó la cirugía estereotáxica para la infección de las neuronas catecolaminérgicas con el AAV y colocación de la cánula y la férula; después de 21 días se comenzaron las optoestimulaciones, se registró la actividad motora durante la última optoestimulación, la del día 8; B) Imagen representativa del trazo de movimiento de un ratón del grupo control EYFP durante la octava sesión de estimulación; C) Imagen representativa del trazo de movimiento de un ratón del grupo experimental ChR2 en el mismo día; D) Distancia recorrida en cm del grupo EYFP (n=7) y ChR2 (n=9) durante la octava sesión de optoestimulación; E) Velocidad expresada en cm por s del grupo EYFP (n=7) y ChR2 (n=9). Las barras representan las medias y las barras de error los SEM * $p < 0.05$.

5.3 Las optoestimulaciones repetitivas causaron un aumento en la liberación de DA en los animales TH-Cre

Se observó mediante microdiálisis *in vivo*, que las optoestimulaciones repetitivas de la vía catecolaminérgica LC-CA1 provocaron un aumento en la liberación dopaminérgica basal en el hipocampo, puesto que los animales del grupo experimental ChR2 mostraron una mayor concentración extracelular de DA en comparación con los del grupo control EYFP. Sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos en la concentración extracelular de NA, GLU o GABA (figura 18). Para comparar los grupos se utilizaron pruebas *t* de “Student” debido a que los datos se distribuyeron de forma normal.



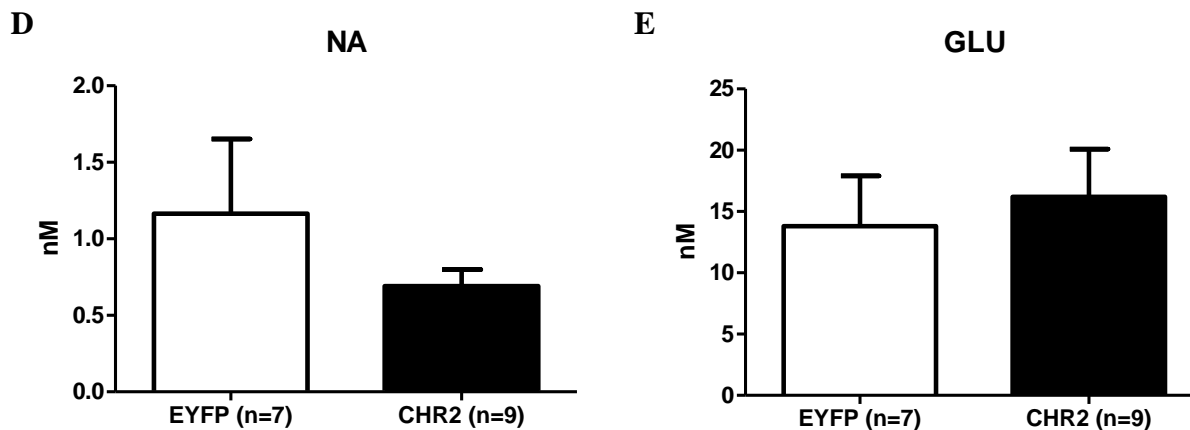


Figura 18. Optoestimulaciones repetitivas causa un aumento en la liberación de DA. A) Diagrama del protocolo experimental, en el cual se muestra que se llevó a cabo la cirugía estereotáxica, 21 días después se realizaron 8 optoestimulaciones y al siguiente día se realizó la microdialisis *in vivo*; B) Concentración extracelular de DA en pM; C) Concentración extracelular de GABA en nM; D) Concentración extracelular de NA en nM; E) Concentración extracelular de GLU en nM. Las barras representan las medias y las barras de error los SEM * $p < 0.05$.

5.4. Las optoestimulaciones repetitivas previnieron un déficit en la memoria de OLM en los animales 4x AD-TH

El sistema catecolaminérgico desempeña un papel importante en la codificación de la novedad contextual, por lo tanto, una vez demostrado que en los animales TH-cre existe aumento en la liberación de DA con respecto a los EYFP. Se procedió a realizar la tarea de memoria de OLM en animales transgénicos para la AD es decir en ratones 4x AD-TH de 10 a 12 meses. Antes que nada, se realizó el análisis de las sesiones de adquisición para demostrar que los sujetos exploraban por igual los dos objetos y que no tenían de inicio preferencia por alguno o por alguna posición. Los ratones que tenían preferencia por alguno de los objetos fueron eliminados de estos análisis. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el índice de reconocimiento entre ambos objetos en la ADQ1 ni para el grupo control EYFP, ni para el grupo experimental. Tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos objetos en la ADQ2 ni para el grupo control, ni para el grupo experimental. Se analizó también el tiempo total de

exploración y no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos en ninguna de las dos adquisiciones (figura 19). Se utilizó la prueba *t* de “*Student*” cuando los datos se distribuyeron de forma normal. Y la versión no paramétrica de esta, la prueba de U de Mann-Whitney cuando no hubo homogeneidad en los datos.

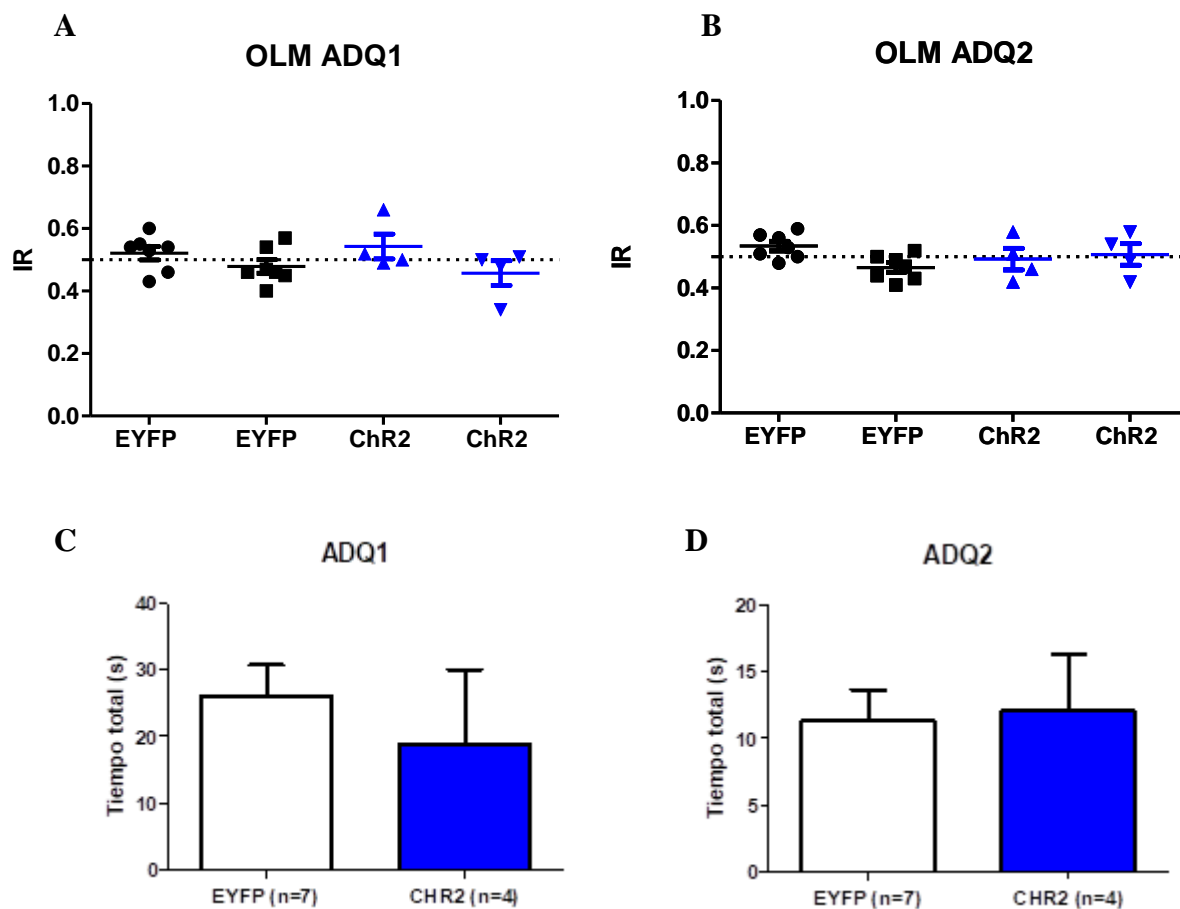


Figura 19. Los animales no muestran preferencia por algún objeto en la ADQ. A) IR de los dos objetos en la ADQ1 de la tarea de OLM; B) IR de los dos objetos en la ADQ2. La línea punteada representa el azar 0.05; C) Tiempo total de exploración en s, del grupo control EYFP (n=7) y del grupo experimental CHR2 (n=4) en la ADQ1; D) Tiempo total de exploración en s, del grupo control EYFP (n=7) y del grupo experimental CHR2 (n=4) en la ADQ2. Los símbolos representan datos individuales, las barras representan las medias y las barras de error los SEM.

Posteriormente, en la prueba de LTM se encontró que los sujetos del grupo experimental CHR2 exploraron más el objeto en la posición novedosa que los sujetos del grupo control EYFP. Así también se encontró que los ratones del grupo experimental ChR2

exploraron menos el objeto en posición familiar que los ratones del grupo control EYFP. Y no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el tiempo total de exploración entre los grupos (figura 20). Se utilizó la prueba U de Mann-Whitney para comparar los grupos debido a que los datos no se distribuyeron de forma normal.

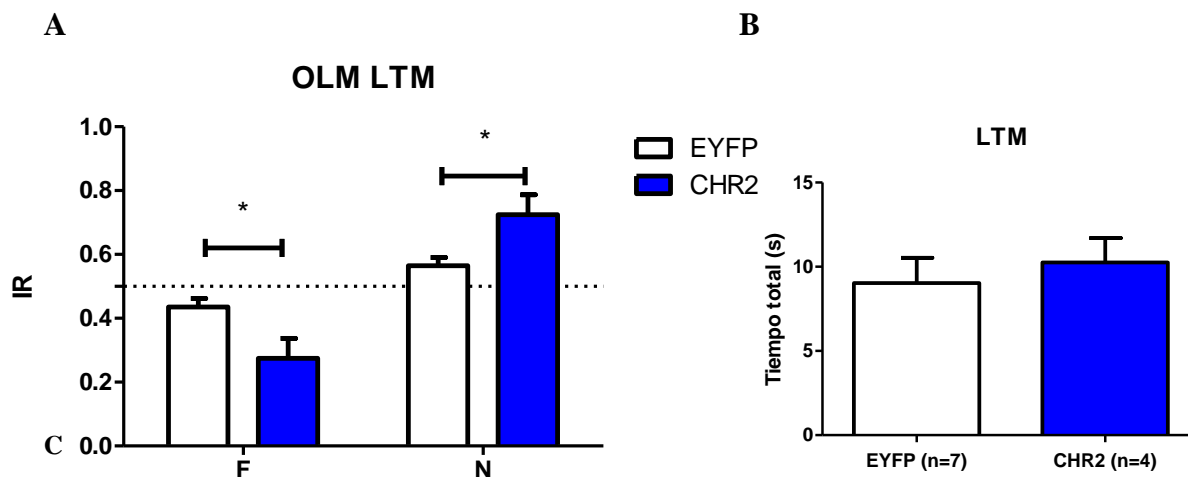


Figura 20. Las optoestimulaciones repetitivas permitieron la recuperación de la memoria de OLM en los animales 4x AD-TH A) Índice de reconocimiento del objeto en posición familiar (F) y del objeto en posición novedosa (N) de los dos grupos, grupo control (EYFP) (barras blancas) y grupo experimental (Chr2) (barras azules) en la prueba de memoria de largo plazo; B) Tiempo total de exploración en s, del grupo control EYFP (n=7) y del grupo experimental CHR2 (n=4) en la LTM. La línea punteada representa el azar 0.5 * p < 0.05. Las barras representan las medias y las barras de error los SEM.

5.5 Memoria del laberinto acuático

Los sujetos del grupo control EYFP y del grupo experimental Chr2 aprendieron de forma similar entre sí, ya que sus latencias de llegada a la plataforma en el MW no mostraron diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las adquisiciones. Se utilizó la prueba U de Mann-Whitney para comparar los grupos debido a que los datos no se distribuyeron de forma normal. La latencia de llegada fue disminuyendo de forma similar en ambos grupos, lo que nos permite inferir que los animales aprendieron la localización de la plataforma (figura 21). Los ratones que no cumplieron con el criterio de aprendizaje (25 segundos como promedio de los 4 ensayos del último día de entrenamiento

ADQ4) fueron eliminados de los siguientes análisis, ya que fue necesario observar los efectos de las optoestimulaciones repetitivas en la memoria a largo plazo.

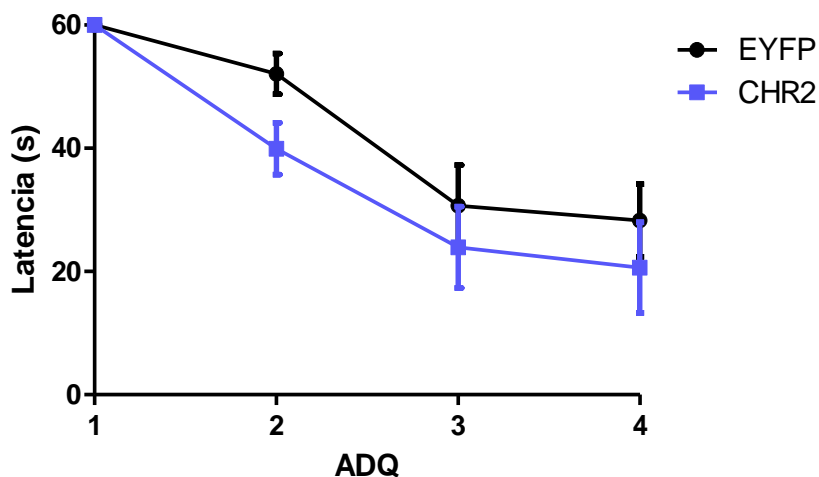
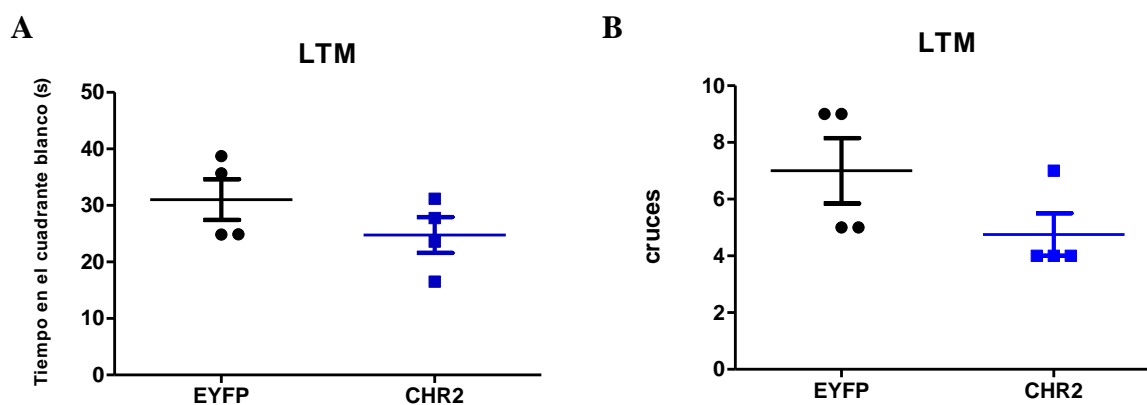


Figura 21. Adquisiciones de la tarea de laberinto acuático. Latencia promedio de llegada a la plataforma (expresada en s) de las 4 adquisiciones de los 4 días de entrenamiento del grupo control EYFP (n=7) y del experimental CHR2 (n=5). Los símbolos representan la media de los grupos y las barras de error los SEM.

Para la LTM se midieron diferentes parámetros, entre ellos: tiempo en el cuadrante blanco, número de cruces y latencia de llegada al lugar previo de ubicación de la plataforma, sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos CHR2 y EYFP para ninguno de estos parámetros (figura 22) Se utilizó la prueba U de Mann-Whitney para comparar los grupos debido a que los datos no se distribuyeron de forma normal.



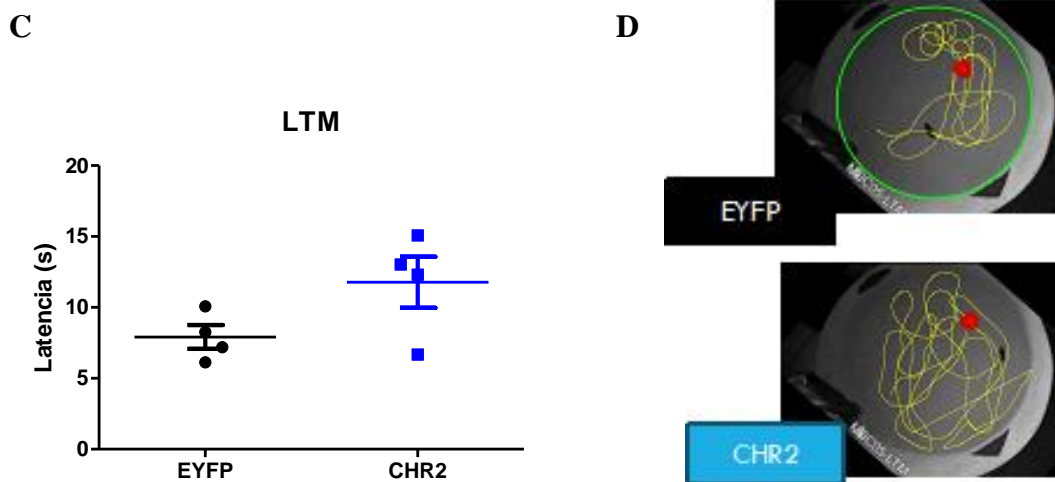


Figura 22. Prueba de memoria a largo plazo (LTM) del laberinto acuático (MW). A) Tiempo en el cuadrante blanco (expresado en s) del grupo control EYFP (n=4) y del experimental CHR2 (n=4); B) Número de cruces en el cuadrante blanco del grupo control EYFP (n= 4) y del experimental CHR2 (n=4); C) Latencia de llegada en s al lugar previo de ubicación de la plataforma del grupo control EYFP (n=4) y del grupo experimental CHR2 (n=4); D) Imágenes representativas del trazo de movimiento de un ratón del grupo control EYFP en la parte superior, como de un ratón del grupo experimental CHR2 en la parte inferior, durante los 60 s de la LTM. Los símbolos representan datos individuales, las barras representan las medias y las barras de error los SEM.

6. Discusión

Se encontró que hay un efecto de las estimulaciones repetitivas de la vía catecolaminérgica LC-CA1 sobre la neurotransmisión de DA y no así de otros neurotransmisores como NA, GABA y GLU. Ya que se observó un aumento en la liberación de DA en animales TH-Cre jóvenes estimulados (Chr2) en comparación con los no estimulados (EYFP). Por otra parte, las optoestimulaciones repetitivas de la vía permitieron a los ratones 4x AD-TH viejos (Chr2) tener memoria de largo plazo en la tarea de OLM, pero no en la de MW.

Un primer punto que resulta importante mencionar es que se observó una colocalización de la marca de la proteína reportera EYFP con la de TH (evaluado por inmunohistoquímica) en todos los animales, lo cual permite concluir que las neuronas

infectadas son catecolaminérgicas y debido a que también se observó la colocalización en las terminales en la región CA1 del hipocampo, se puede inferir que la vía estimulada fue específicamente la vía catecolaminérgica del LC-CA1. Esto resulta importante porque significa que los resultados de la actividad motora, la neurotransmisión y la conducta son consecuencia específica de la activación repetitiva de esta vía.

Este estudio se inspiró a partir de los efectos neuroprotectores contra la AD que se observan tras la exposición repetida a la novedad, en la memoria de largo plazo, en la neurotransmisión de catecolaminas y en la prevención de la degeneración de las fibras catecolaminérgicas (Velázquez, 2018), ya que el disparo de las neuronas catecolaminérgicas del LC es especialmente sensible a la novedad contextual (Takeuchi et al., 2017). Resulta interesante que la estimulación específica de la vía LC-CA1 desencadene efectos en la conducta de OLM en un modelo de AD ya que cuando se expone a un sujeto a un ambiente rico en novedad o a un ambiente enriquecido que involucra más aspectos, es de esperarse que esta exposición active otras regiones y vías cerebrales que generen un efecto neuroprotector. En este sentido, en el presente trabajo la manipulación únicamente de estas neuronas catecolaminérgicas indujo cambios conductuales, lo que recalca la relevancia de la vía en la memoria espacial de OLM. Sin embargo, falta determinar si el efecto observado en la tarea de OLM, se debe a un aumento en la liberación de DA porque, aunque en este estudio se encontró que las optoestimulaciones repetitivas permitieron un aumento en la liberación de DA en el hipocampo y no así en otros neurotransmisores, este resultado fue encontrado en ratones jóvenes TH-Cre a los que no se les realizaron pruebas de memoria. En función de esto se propone hacer los experimentos de microdiálisis con animales 4x AD-TH como una posible continuación del presente trabajo para poder hacer aseveraciones más específicas que permitan integrar los resultados

de la neurotransmisión con los de la conducta. Así también, se sugiere realizar ensayos farmacológicos en los que se utilicen inhibidores dopaminérgicos y/o noradrenérgicos durante las optoestimulaciones en ratones 4x AD-TH lo cual permitiría dilucidar si el efecto observado en la tarea de OLM se debe a la DA o a la NA, o a ambas. Esto porque el LC puede coliberar estos dos neurotransmisores al hipocampo y así modificar la memoria espacial (Duszkiewicz et al., 2019; Kempadoo et al., 2016)

Fue inesperado que no se observaran cambios en la liberación de NA, puesto que el LC es un núcleo noradrenérgico por excelencia. Esto podría explicarse si hubiera un aumento transitorio de NA, es decir, de manera contingente a las optoestimulaciones pero que el incremento en la liberación de NA decaiga rápidamente y no se vea reflejado en las concentraciones extracelulares medidas un día después. Un experimento que podría resolver lo anterior podría consistir en realizar la microdiálisis de manera simultánea a las optoestimulaciones, lo que permitiría demostrar un efecto transitorio en la liberación noradrenérgica. Ahora bien, si en este experimento no viéramos cambios en NA una posible explicación pudiera ser que exista una inhibición de la enzima dopamina β -hidroxilasa (DBH) por sustrato, debido al aumento en la síntesis de DA. En las neuronas del LC, la dopamina es sintetizada en el citosol y luego transportada a las vesículas sinápticas donde es convertida a NE por la enzima DBH. Se ha estimado que la tasa de conversión es más lenta que la de la tasa de transporte. En las terminales del LC esto puede significar que la DA no se convierte completamente a NA durante tiempos de alto recambio vesicular debido a un incremento en el disparo, causando una liberación de DA y no de NE (Sonneborn et al., 2021).

Por otra parte, continuando con la discusión de los datos conductuales observados en animales 4x AD-TH en donde se encontró que el IR del objeto en la posición novedosa del

grupo experimental (CHR2) es mayor que el IR del objeto en posición novedosa del grupo no estimulado (EYFP). Podemos afirmar que esta diferencia no se debe a un aumento en la actividad motora, ya que se realizó la comparación de los tiempos totales de exploración, tanto de las adquisiciones como de la LTM y no se encontraron diferencias entre los grupos. Lo que permite concluir que las diferencias en los índices de reconocimiento de la LTM no se deben a que los ratones del grupo experimental hayan explorado más tiempo los objetos durante las adquisiciones o en la propia prueba de LTM, sino que estas diferencias se deben a que los ratones estimulados tienen memoria a largo plazo mientras que los no estimulados no la tienen. Esta es una aclaración importante debido a que se encontró que durante las optoestimulaciones, los ratones TH-Cre jóvenes tuvieron mayor actividad motora. Por esta razón y para evitar más variables resultó necesario hacer las adquisiciones de la tarea de OLM de forma independiente a las optoestimulaciones. Cabe mencionar que resulta interesante que haya un aumento en la actividad motora durante las optoestimulaciones ya que este aumento puede reflejar un incremento en la ansiedad de los ratones debido a la estimulación catecolaminérgica de las fibras provenientes del LC (Omoluabi et al., 2021); sin embargo, no se exploró más a fondo este resultado en términos de estrés. A pesar de que se ha visto que el LC responde en paralelo a respuestas de estrés periféricas, a una gran variedad de estímulos estresantes tanto cognitivos como físicos (Ross et al., 2015).

Resulta importante estudiar el sistema catecolaminérgico ya que, se sabe que las catecolaminas actúan como neuromoduladores alterando la conectividad funcional por medio de la modificación de características neuronales intrínsecas y de la reconfiguración de la eficiencia sináptica (Madadi et al., 2019). La activación de los receptores D1 a través de proteínas G, aumenta la concentración intracelular de AMPc, activando a la proteína

cinasa A (PKA) quien fosforila receptores glutamatérgicos, permitiéndoles cambiar su cinética de activación y con esto aumentar su tiempo de apertura (Kaushik et al., 2022). La activación de PKA inhibe la actividad de fosfatasa lo que aumenta la fosforilación de la calcio/calmodulina proteína cinasa tipo II (CAMKII) (Bermúdez-Rattoni, 2004) y también causa que las subunidades catalíticas de PKA recluten a las vías de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK). Así la PKA y las MAPK se translocan a núcleo donde pueden fosforilar blancos nucleares como otras cinasas, que a su vez fosforilan factores de transcripción, como CREB, lo que regula cambios en la síntesis de nuevas proteínas y aumento de la cantidad de receptores glutamatérgicos tanto en sinapsis preexistentes como en nuevas sinapsis, lo que permite que se establezca una memoria de largo plazo (Abel & Lattal, 2001). Es posible especular que, las optoestimulaciones repetitivas de la vía catecolaminérgica del LC-CA1 permitieron un aumento en la liberación de DA en el hipocampo, lo que generó esta cascada de señalización que induciendo modificaciones en la plasticidad sináptica de los ratones transgénicos para la AD permitió que sean capaces de consolidar y recuperar la información almacenada expresando memoria espacial a largo plazo en la tarea de OLM llevada a cabo 24 h después de la última optoestimulación. Es preciso realizar otros estudios que demuestren la veracidad de esta hipótesis ya que para el desarrollo del presente trabajo no se realizó la microdiálisis en los ratones viejos 4x AD-TH, cuantificación de receptores glutamatérgicos, experimentos de potenciación a largo plazo u otras mediciones o aproximaciones que pudieran arrojar información necesaria para sustentar un mecanismo neurofisiológico que explique el efecto de prevención de los déficits de memoria observados en la tarea de OLM en los ratones viejos 4x AD-TH.

Además, es preciso mencionar que el efecto de prevención de los déficits de memoria no se observó en los ratones 4x AD-TH en la tarea de MW. No se encontraron diferencias

en los parámetros medidos en esta prueba entre el grupo estimulado (ChR2) y el control (EYFP). Esto podría explicarse debido a que la tarea de MW fue implementada después del OLM o debido a la tarea como tal. Ya que, si bien el MW también es una tarea de memoria espacial dependiente de hipocampo, esta prueba al igual que otras, como la de miedo condicionado son dependientes de la codificación y recuperación de eventos de entrenamiento emocionalmente aversivos e inherentemente estresantes. La liberación de hormonas relacionadas con el estrés puede por si misma modular la memoria y oscurecer los efectos de las estimulaciones repetitivas (Vogel-Ciernia, 2015). También es probable que el efecto de las estimulaciones sea transitorio y que debido a esto no sea posible observar diferencias entre los grupos en la tarea de MW, ya que esta fue implementada 48 h después de la última estimulación. Para resolver esta posibilidad se podría hacer la prueba de MW 24 h después de la última estimulación o bien la prueba de OLM 48 h después de llevada a cabo la última estimulación. Lo que resolvería la interrogante de si es por el tiempo transcurrido o por el tipo de tarea que no se observan diferencias en la LTM del MW. Así bien, como se mencionó en la introducción, la disfunción en la AD es de múltiples sistemas de neurotransmisión los cuales involucran degeneración en diferentes estructuras que no se limitan al LC o al hipocampo y es por tanto quizás necesario modificar otras áreas cerebrales para poder observar cambios conductuales más robustos. También es probable que las 8 optoestimulaciones no fueran suficientes para permitir cambios permanentes en la conducta de los ratones.

7. Conclusiones

Con los resultados obtenidos asevero que la manipulación optogenética repetitiva de la vía catecolaminérgica LC-CA1 puede tener un efecto de prevención de los déficits de memoria en la tarea de OLM en ratones 4x AD-TH.

Debido a que se encontró que las estimulaciones repetitivas en ratones jóvenes TH-Cre causaron un aumento en la liberación basal de DA en comparación con los ratones no estimulados, esto podría sugerir que en los ratones 4x AD-TH también se esté presentando este aumento en la liberación de DA y que este aumento medie el efecto observado en la tarea de OLM, sin embargo, se requieren realizar otros estudios que demuestren la veracidad de esta hipótesis.

El presente trabajo aporta evidencia de que las catecolaminas son un sistema de neurotransmisión importante que puede mediar efectos protectores y de prevención para el déficit de memoria presente en la AD, sin embargo, se queda corto para demostrar un efecto neuroprotector robusto a largo plazo, en diferentes tareas conductuales, así como en diferentes correlatos neurobiológicos, que puedan sustentar una hipótesis de causalidad.

8. Referencias

- Abel, T., & Lattal, K. M. (2001). Molecular mechanisms of memory acquisition, consolidation and retrieval. *Current Opinion in Neurobiology*, *11*(2), 180–187. [https://doi.org/10.1016/S0959-4388\(00\)00194-X](https://doi.org/10.1016/S0959-4388(00)00194-X)
- Armstrong, R. A. (2013). What causes Alzheimer's disease? *Folia Neuropathologica*, *51*(3), 169–188. <https://doi.org/10.5114/fn.2013.37702>
- Barage, S. H., & Sonawane, K. D. (2015). Amyloid cascade hypothesis: Pathogenesis and therapeutic strategies in Alzheimer's disease. *Neuropeptides*, *52*, 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2015.06.008>
- Bermúdez-Rattoni, F. (2004). Molecular mechanisms of taste-recognition memory. *Nature Reviews Neuroscience*, *5*(3), 209–217. <https://doi.org/10.1038/nrn1344>
- Blennow, K., de Leon, M. J., & Zetterberg, H. (2006). Alzheimer's disease. *Lancet*, *368*(9533), 387–403. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)69113-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)69113-7)
- Bostancıklıoğlu, M. (2020). An update on memory formation and retrieval: An engram-centric approach. *Alzheimer's & Dementia*, *16*(6), 926–937. <https://doi.org/10.1002/ALZ.12071>
- Braak, H., & Braak, E. (1991). Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathologica*, *82*(4), 239–259. <https://doi.org/10.1007/BF00308809>
- Braak, Heiko, & Del Tredici, K. (2015). The preclinical phase of the pathological process underlying sporadic Alzheimer's disease. *Brain*, *138*(10), 2814–2833. <https://doi.org/10.1093/brain/awv236>
- Carlson, N. R. (2014). *Fisiología de la conducta*. Pearson Educación.
- Castellani, R. J., Plascencia-Villa, G., & Perry, G. (2019). The amyloid cascade and Alzheimer's disease therapeutics: theory versus observation. *Laboratory Investigation*, *99*(7), 958–970. <https://doi.org/10.1038/s41374-019-0231-z>
- De-Paula, V. J., Radanovic, M., Diniz, B. S., & Forlenza, O. V. (2012). Alzheimer's disease. *Sub-Cellular Biochemistry*, *65*, 329–352. https://doi.org/10.1007/978-94-007-5416-4_14
- De Marco, M., & Venneri, A. (2018). Volume and connectivity of the ventral tegmental area are linked to neurocognitive signatures of Alzheimer's disease in humans. *Journal of Alzheimer's Disease*, *63*(1), 167–180. <https://doi.org/10.3233/JAD-171018>
- de Paula, V. de J. R., Guimarães, F. M., Diniz, B. S., & Forlenza, O. V. (2009). Neurobiological pathways to Alzheimer's disease: Amyloid-beta, TAU protein or both? *Dementia e Neuropsychologia*, *3*(3), 188–194. <https://doi.org/10.1590/s1980-57642009dn30300003>
- Demuro, A., Parker, I., & Stutzmann, G. E. (2010). Calcium signaling and amyloid toxicity in Alzheimer disease. *Journal of Biological Chemistry*, *285*(17), 12463–12468. <https://doi.org/10.1074/jbc.R109.080895>
- Denninger, J. K., Smith, B. M., & Kirby, E. D. (2018). Novel object recognition and object location behavioral testing in mice on a budget. *Journal of Visualized Experiments*, *2018*(141), 1–10. <https://doi.org/10.3791/58593>
- Drewes, G. (2004). *MARKing tau for tangles and toxicity*. *29*(10). <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2004.08.001>
- Dudas, B. (2014). *The central catecholaminergic system: anatomy, functions and disorders*. Nova Science Publishers.

- Duszkiewicz, A. J., McNamara, C. G., Takeuchi, T., & Genzel, L. (2019). Novelty and Dopaminergic Modulation of Memory Persistence: A Tale of Two Systems. *Trends in Neurosciences*, 42(2), 102–114. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2018.10.002>
- Feinstein, S. C., & Wilson, L. (2005). Inability of tau to properly regulate neuronal microtubule dynamics: A loss-of-function mechanism by which tau might mediate neuronal cell death. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1739(2), 268–279. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2004.07.002>
- Flores, Á., Saravia, R., Maldonado, R., & Berrendero, F. (2015). Orexins and fear: Implications for the treatment of anxiety disorders. *Trends in Neurosciences*, 38(9), 550–559. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2015.06.005>
- Gálvez-Márquez, D. K., Salgado-ménez, M., Moreno-castilla, P., Rodríguez-durán, L., & Escobar, M. L. (2022). Spatial contextual recognition memory updating is modulated by dopamine release in the dorsal hippocampus from the locus coeruleus. *PNAS*, 1–11. <https://doi.org/10.1073/pnas>.
- Gao, Y., Tan, L., Yu, J.-T., & Tan, L. (2018). Tau in Alzheimer's Disease: Mechanisms and Therapeutic Strategies. *Current Alzheimer Research*, 15(3), 283–300. <https://doi.org/10.2174/1567205014666170417111859>
- Grudzien, A., Shaw, P., Weintraub, S., Bigio, E., Mash, D. C., & Mesulam, M. M. (2007). Locus coeruleus neurofibrillary degeneration in aging, mild cognitive impairment and early Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 28(3), 327–335. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2006.02.007>
- Gutierrez-Robledo LM, A.-C. I. (2015). Dementia in Mexico: The need for a national Alzheimer's plan. *Gaceta*, 151, 667–673. www.anmm.org.mx
- Guzmán, K., Osorio, D., & Bermúdez, F. (2022). Cognitive Impairment in Alzheimer's and Metabolic Diseases: A Catecholaminergic Hypothesis. *Neuroscience*, 497, 308–323. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2022.05.031>
- Häusser, M. (2014). Optogenetics : the age of light. *Nature Publishing Group*, 11(10), 1012–1014. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3111>
- Herrera, C. G., Adamantidis, A., Zhang, F., Deisseroth, K., y de Lecea, L. (2014). Optogenetic Dissection of Neural Circuit Function in Behaving Animals. *Neuromethods*, 143–160. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1963-5_7
- James, T., Kula, B., Choi, S., Khan, S. S., Bekar, L. K., & Smith, N. A. (2020). Locus coeruleus in memory formation and Alzheimer's disease. *European Journal of Neuroscience*, December 2019, 1–12. <https://doi.org/10.1111/ejn.15045>
- Jeong, S. (2017a). Molecular and cellular basis of neurodegeneration in alzheimer's disease. In *Molecules and Cells* (Vol. 40, Issue 9). <https://doi.org/10.14348/molcells.2017.0096>
- Jeong, S. (2017b). Molecular and cellular basis of neurodegeneration in alzheimer's disease. *Molecules and Cells*, 40(9), 613–620. <https://doi.org/10.14348/molcells.2017.0096>
- Kalinin, S., Polak, P. E., Lin, S. X., Sakharkar, A. J., Pandey, S. C., & Feinstein, D. L. (2012). The noradrenaline precursor L-DOPS reduces pathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 33(8), 1651–1663. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2011.04.012>.The
- Kaushik, M., Kaushik, P., & Parvez, S. (2022). Memory related molecular signatures: The pivots for memory consolidation and Alzheimer's related memory decline. *Ageing Research Reviews*, 76(March 2021), 101577.

- <https://doi.org/10.1016/j.arr.2022.101577>
- Kelly, S. C., He, B., Perez, S. E., Ginsberg, S. D., Mufson, E. J., & Counts, S. E. (2017). Locus coeruleus cellular and molecular pathology during the progression of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica Communications*, 5(1), 8. <https://doi.org/10.1186/s40478-017-0411-2>
- 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), 14835–14840. <https://doi.org/10.1073/pnas.1616515114>
- Li, S., Jin, M., Zhang, D., Yang, T., Koeglsperger, T., Fu, H., & Selkoe, D. J. (2013). Environmental Novelty Activates β 2-Adrenergic Signaling to Prevent the Impairment of Hippocampal LTP by A β Oligomers. *Neuron*, 77(5), 929–941. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.12.040>
- Liu, X & Weinshenker, D. (2015). Norepinephrine protects against A β toxicity via TrkB. *Physiology & Behavior*, 44(1), 251–260. <https://doi.org/10.3233/JAD-141062>
- Liu, Y., Yoo, M. J., Savonenko, A., Stirling, W., Price, D. L., Borchelt, D. R., Mamounas, L., Lyons, W. E., Blue, M. E., & Lee, M. K. (2008). Amyloid pathology is associated with progressive monoaminergic neurodegeneration in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience*, 28(51), 13805–13814. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4218-08.2008>
- López, A., C. (2021). *Estudio sobre el efecto de la estimulación optogenética de las proyecciones catecolaminérgicas hipocámpales en la plasticidad sináptica y la memoria espacial de un modelo animal de la enfermedad de Alzheimer* [Tesis de licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México]. <https://repositorio.unam.mx/contenidos/3582129>
- Madadi, M., Vahabie, A. H., & Valizadeh, A. (2019). Review paper: Dopaminergic modulation of synaptic plasticity, its role in neuropsychiatric disorders, and its computational modeling. *Basic and Clinical Neuroscience*, 10(1), 1–12. <https://doi.org/10.32598/bcn.9.10.125>
- Moreno-Castilla, P., Rodriguez-Duran, L. F., Guzman-Ramos, K., Barcenas-Femat, A., Escobar, M. L., & Bermudez-Rattoni, F. (2016). Dopaminergic neurotransmission dysfunction induced by amyloid- β transforms cortical long-term potentiation into long-term depression and produces memory impairment. *Neurobiology of Aging*, 41, 187–199. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2016.02.021>
- Nithianantharajah, J., & Hannan, A. J. (2009). The neurobiology of brain and cognitive reserve: Mental and physical activity as modulators of brain disorders. *Progress in Neurobiology*, 89(4), 369–382. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2009.10.001>
- Oboudiyat, C., Glazer, H., Isaacson, R. S., Seifan, A., & Greer, C. (2013). *Alzheimer's Disease*. 10021.
- Omoluabi, T., Torrance, S. E., Maziar, A., Ghosh, A., Power, K. D., Reinhardt, C., Harley, C. W., & Yuan, Q. (2021). Novelty-like activation of locus coeruleus protects against deleterious human pretangle tau effects while stress-inducing activation worsens its effects. *Alzheimer's and Dementia: Translational Research and Clinical Interventions*, 7(1), 1–13. <https://doi.org/10.1002/trc2.12231>
- 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.
<https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.04.017>
- Querfurth, H. W., & Laferla, F. M. (2010). *Alzheimer's Disease*. 329–344.
- Robertson, I. H. (2013). A noradrenergic theory of cognitive reserve: Implications for Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 34(1), 298–308.
<https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2012.05.019>
- Ross, J. A., McGonigle, P., & Van Bockstaele, E. J. (2015). Locus coeruleus, norepinephrine and A β peptides in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Stress*, 2, 73–84. <https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2015.09.002>
- Samanta, M. K., Wilson, B., Santhi, K., Kumar, K. P., & Suresh, B. (2006). Alzheimer disease and its management: A review. *American Journal of Therapeutics*, 13(6), 516–526.
<http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L44813682%5Cnhttp://dx.doi.org/10.1097/01.mjt.0000208274.80496.f1>
- Sara, S. J., Vankov, A., & Hervé, A. (1994). Locus coeruleus-evoked responses in behaving rats: a clue to the role of noradrenaline in memory. *Brain Research Bulletin*, 35(5–6), 457–465. [https://doi.org/10.1016/0361-9230\(94\)90159-7](https://doi.org/10.1016/0361-9230(94)90159-7)
- Savage, S., & Ma, D. (2014). Animal behaviour testing: Memory. *British Journal of Anaesthesia*, 113(1), 6–9. <https://doi.org/10.1093/bja/aeu014>
- Selkoe. (2004). Alzheimer Disease : Mechanistic Understanding Predicts Novel Therapies. *Annals of Internal Medicine*, 140, 627–638.
- Siegel, G. J. (1999). *Basic Neurochemistry, Molecular, Cellular, and Medical Aspects*. Elsevier Academic Press.
- Sonneborn, A., Greene, R. W., & Hines. (2021). Norepinephrine transporter antagonism prevents dopamine dependent synaptic plasticity in the mouse dorsal hippocampus. *Neuroscience Letters*, 740(135450), 1–13.
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2020.135450>
- Soria Lopez, J. A., González, H. M., & Léger, G. C. (2019). Alzheimer's disease. *Handbook of Clinical Neurology*, 167, 231–255. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804766-8.00013-3>
- Spires-Jones, T. L., & Hyman, B. T. (2014). The Intersection of Amyloid Beta and Tau at Synapses in Alzheimer's Disease. *Neuron*, 82(4), 756–771.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.05.004>
- Squire, L. R., Berg, D., Bloom, F. E., Du Lac, S., Ghosh, A. y Spitzer, N. C. (2013). *Fundamental neuroscience*. Elsevier Academic.
- Takeuchi, T., Duszkiewicz, A. J., Sonneborn, A., Spooner, P. A., Yamasaki, M., Watanabe, M., Smith, C. C., Fernández, G., Greene, R. W., & Morris, R. G. M. (2017). *memory*. 537(7620), 357–362. <https://doi.org/10.1038/nature19325>
- Then, F. S., Luck, T., Lippa, M., König, H. H., Angermeyer, M. C., & Riedel-Heller, S. G. (2015). Differential effects of enriched environment at work on cognitive decline in old age. *Neurology*, 84(21), 2169–2176.
<https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000001605>
- Theofilas, P., Ehrenberg, A. J., Dunlop, S., Alho, A. T., Suemoto, C. K., & Ferretti-rebustini, R. E. D. L. (2017). Locus coeruleus volume and cell population changes during Alzheimer's disease progression: a stereological study in human postmortem brains with potential implication for early_stage biomarker discovery. *Alzheimers Dement.*, 13(3), 236–246. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2016.06.236>

- Trillo, L., Das, D., Hsieh, W., Medina, B., Moghadam, S., Lin, B., Dang, V., Sanchez, M. M., De Miguel, Z., Ashford, J. W., & Salehi, A. (2013). Ascending monoaminergic systems alterations in Alzheimer's disease. translating basic science into clinical care. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 37(8), 1363–1379. <https://doi.org/10.1016/J.NEUBIOREV.2013.05.008>
- Velázquez, C. (2018). *Efecto de la estimulación catecolaminérgica en las alteraciones cognitivas y en la acumulación de beta-amiloide en modelos de la enfermedad de Alzheimer*. [Tesis de maestría, Universidad Nacional Autónoma de México]. <https://repositorio.unam.mx/contenidos/3543147>
- Vogel-Ciernia, A. and M. A. W. (2015). Examining Object Location and Object Recognition Memory in Mice. *Current Protocols in Neuroscience*, 72(2), 181–204. <https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0831s69.Examining>
- Wang, K., Ye, X., Huang, T., Yang, X., & Zou, L. (2019). *Optogenetics-induced activation of glutamate receptors improves memory function in mice with Alzheimer ' s disease*. *Ll*, 2147–2155. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.262593>
- Wei, Z., Meng, X., Fatimy, R. El, Sun, B., Mai, D., Arora, R., Zeng, A., Xu, P., Qu, S., Krichevsky, A. M., Selkoe, D. J., Li, S., Maternity, S. F., Hospital, I., & Hospital, S. (2020). Environmental Enrichment Prevents A β Oligomer-induced Synaptic Dysfunction through miRNA-132 and HDAC3 Signaling Pathways. *Neurobiol Dis*. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2019.104617.Environmental>
- Xu, H., Rajsombath, M. M., Weikop, P., & Selkoe, D. J. (2018). Enriched environment enhances β -adrenergic signaling to prevent microglia inflammation by amyloid- β . *EMBO Molecular Medicine*, 10(9), 1–17. <https://doi.org/10.15252/emmm.201808931>
- Yizhar, O., Fenno, L. E., Davidson, T. J., Mogri, M., & Deisseroth, K. (2011). Primer Optogenetics in Neural Systems. *Neuron*, 71(1), 9–34. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.06.004>
- Ziegler-Waldkirch, S., d'Errico, P., Sauer, J., Erny, D., Savanthrapadian, S., Loreth, D., Katzmarski, N., Blank, T., Bartos, M., Prinz, M., & Meyer-Luehmann, M. (2018). Seed-induced A β deposition is modulated by microglia under environmental enrichment in a mouse model of Alzheimer's disease. *The EMBO Journal*, 37(2), 167–182. <https://doi.org/10.15252/embj.201797021>