



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

LIBERACIÓN DE AMINOÁCIDOS Y CATECOLAMINAS EN
CORTEZA INSULAR E HIPOCAMPO DURANTE EL
RECONOCIMIENTO DE OBJETOS EN UN MODELO MURINO
TRANSGÉNICO PARA LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

CASTRO CRUZ MÓNICA DEL CARMEN



**DIRECTOR DE TESIS:
DRA. KIOKO RUBÍ GUZMÁN RAMOS**

México, D. F.

Abril 2011



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.

HOJA DE DATOS DEL JURADO

1. Datos del alumno.

Castro
Cruz
Mónica del Carmen
56 60 00 28
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
304288809

2. Tutora

Dra.
Kioko Rubí
Guzmán
Ramos

3. Datos del sinodal 1

Dr.
Federico
Bermúdez
Rattoni

4. Datos del sinodal 2

Dra.
Elsa Guadalupe
Escamilla
Chimal

5. Datos del sinodal 3

Dr.
Paul
Carrillo
Mora

6. Datos del sinodal 4

Biól.
Ana Pamela
Salcedo
Tello

7. Datos del trabajo escrito

Liberación de aminoácidos y catecolaminas
en corteza insular e hipocampo,
durante el reconocimiento de objetos
en un modelo murino transgénico para
la enfermedad de Alzheimer
72 p
2011

A mis padres María del Carmen Cruz Espinoza y Enrique Donaldó Castro Moctezuma, por darme siempre su apoyo, este logro es enteramente suyo.

A mis hermanos Chucho, Ana e Israel, gracias por enseñarme tantas cosas, los quiero.

A Hugo Montaña Castillo, gracias por ser mi apoyo en los momentos de duda y por impulsar mis ideas cuando el miedo está presente, por tu amor, pero sobre todo gracias por caminar junto a mí.

Agradecimientos Académicos

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Neurobiología del Aprendizaje y la Memoria, en el Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México, con apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) 60478, y de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA- UNAM) IN216709.

Agradezco al Dr. Federico Bermúdez Rattóni por haberme permitido incorporarme a su equipo de trabajo y por el apoyo académico otorgado.

Gracias al apoyo de las técnicas académicas Israela Balderas Moreno y Perla Moreno Castilla.

Así como del constante e invaluable trabajo de Oreste Carbajal.

Agradecimientos personales

Agradecer es una parte muy difícil, cada persona en mi vida es importante. Gracias a los excelentes profesores que he tenido desde la ENP 8, hasta la Facultad de Ciencias de la UNAM. Su trabajo es esencial para continuar en la búsqueda del conocimiento. Así como a mis compañeros, con quienes compartí grandes momentos.

A la Dra. Kiojo Guzmán Ramos por haberme permitido trabajar en este proyecto, por sus invaluable enseñanzas y por los siempre buenos y necesarios consejos.

A la Dra. Elsa Escamilla, Dr. Paul Carrillo y Biól. Pamela Salcedo, por sus valiosos comentarios sobre el presente trabajo.

A Quetzalcóatl No. 52

A mi súper familia, amigos incondicionales, con los que aprendí montones en la prepa: Sammy, Joshua, Rodrigo, Jesús, Bob, Alondra, Daniel, Gustavo, Dulce, Jessica y Carolina Basilio.

Gracias a mi amigo, hermano, cómplice y apoyo Emili "Pandora box" Díaz Santiago, por estar conmigo a pesar de la adversidad, de la distancia y del cambio ¡te quiero hartito!

A Isaac feliz, por fomentar en mí buenas y malas ideas.

Al coro de la Facultad de Ciencias, por ser mi actividad de catarsis durante 2 años.

A mis compañeros de laboratorio: Daniel, Julio, Azul, Lucía, Cristina, Chelo, Katia, Gerardo, Ernesto, Armando, Eduardo y Paola por los buenos momentos y las charlas amenas.

ÍNDICE

Abreviaturas-----	7
Resumen-----	9
I. MARCO TEÓRICO	
1.1 Resumen histórico sobre el estudio de la memoria y el aprendizaje----	11
1.2 Del aprendizaje a la memoria de corto y largo plazo-----	14
1.3 Memoria de reconocimiento -----	17
1.4 Paradigma de reconocimiento de objetos-----	21
1.5 Sistemas neuroquímicos y memoria de reconocimiento-----	22
1.5.1 GABA, Glutamato-----	23
1.5.2 Norepinefrina y dopamina-----	26
1.6 Enfermedad de Alzheimer-----	30
1.6.1 Patología molecular-----	31
1.7 Modelo murino 3xTg- EA-----	36
1.8 Dopamina y Alzheimer-----	39
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA-----	41
III. HIPÓTESIS-----	41
IV. OBJETIVO GENERAL-----	42
3.1 Objetivos particulares-----	42
V. METODO EXPERIMENTAL	
5.1 Modelo animal-----	43
5.2 Operación estereotáxica-----	43
5.3 Habitación-----	44
5.4 Microdiálisis en libre movimiento durante la adquisición de la tarea de reconocimiento de objetos -----	44
5.5 Protocolo de la tarea de reconocimiento de objetos-----	46

5.6	Análisis de muestras-----	47
5.6.1	Derivatización-----	47
5.6.2	Electroforesis capilar-----	47
5.6.3	Integración (Cuantificación de analitos) -----	49
5.7	Genotipificación-----	49
5.8	Histología-----	51
5.9	Análisis estadístico-----	52
5.9.1	Conducta-----	52
5.9.2	Análisis de neurotransmisores-----	52
VI.	RESULTADOS	
6.1	Déficit en la MLP de la MRO en ratones 3xTg- EA de 9 meses-----	53
6.2	Concentraciones de GABA, GLUT y NE no muestran cambios significativos durante la ADQ de la MRO-----	55
6.3	Ratones 3xTg- EA de 9 meses no muestran incremento en los niveles de dopamina extracelular ante estímulo nuevo en la MRO-----	57
VII.	DISCUSIÓN	
7.1	Déficit en MLP de la MRO-----	59
7.2	Déficit de liberación de DA en ratones 3xTg- EA-----	61
VIII.	CONCLUSIONES-----	65
IX.	LITERATURA CITADA-----	66
X.	ANEXOS-----	75

ABREVIATURAS

ADQ	Adquisición
AMPA	ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico
PPA	Proteína precursora amiloide
β A	Péptido β -Amiloide
β A40	Péptido β -Amiloide 1- 40 (40 aminoácidos)
β A42	Péptido β -Amiloide 1- 42 (42 aminoácidos)
BACE	Enzima de corte del sitio beta de la PPA
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
CI	Corteza insular
CPF	Corteza prefrontal
DA	Dopamina
EC	Electroforesis capilar
EI	Estándar interno
GAD	descarboxilasa del ácido glutámico
GABA	Ácido gamma-amino butírico
GLUT	Glutamato
HIP	Hipocampo
IHQ	Inmunohistoquímica
IRO	Índice de reconocimiento de objetos
KA	Kainato
LAM	Laberinto acuático de Morris
%LB	Porcentaje de liberación basal
MAPK	Proteína cinasa asociada a microtúbulos
MCP	Memoria de corto plazo
MLP	Memoria de largo plazo
MNF	Marañas neurofibrilares
MRO	Memoria de reconocimiento de objetos
NE	Norepinefrina
NF	Neurofibrillas
NMDA	N-metil-D-aspartato
PCR	Reacción en cadena de la Polimerasa
PKA	Proteína cinasa A

PKC	Proteína cinasa C
PS1	Presenilina 1
RO	Reconocimiento de objetos
PCP	Potenciación a corto plazo
PLP	Potenciación a largo plazo
SN	Sistema nervioso
3xTg-EA	Ratones triple transgénico para la enfermedad de Alzheimer
WT	Ratones silvestres

RESUMEN

La enfermedad de Alzheimer es una enfermedad neurodegenerativa que afecta actualmente a 35 millones de personas en el mundo. Gracias a la descripción de las alteraciones conductuales, moleculares y genéticas que se presentan en esta enfermedad, se han desarrollado modelos animales que expresan gradualmente varias características patológicas de la enfermedad de Alzheimer, lo que ha contribuido a la comprensión y descripción cada vez más específica de cómo se desencadena la enfermedad. En el presente trabajo se utilizó un modelo murino que alberga tres mutaciones de proteínas asociadas con la enfermedad de Alzheimer: tau, proteína precursora amiloide y presenilina 1.

Los pacientes que presentan Alzheimer tienen un deterioro en la memoria de reconocimiento desde las fases iniciales de la enfermedad, por ello se decidió utilizar el paradigma conductual de reconocimiento de objetos, tarea ampliamente usada en la investigación de la memoria de reconocimiento.

Esta enfermedad se encuentra asociada a una desregulación en la liberación de neurotransmisores, principalmente acetilcolina, que ha sido ampliamente estudiada; sin embargo no existe suficiente información acerca de la posible desregulación de otros neurotransmisores importantes en procesos de memoria y aprendizaje. Empleando microdiálisis en libre movimiento se monitorearon los cambios extracelulares de dopamina (DA), norepinefrina (NE), ácido gamma amino butírico (GABA) y glutamato (GLUT) durante la adquisición de la MRO en la CI, estructura importante para la adquisición y consolidación de ésta. Se compararon los cambios en ratones transgénicos y de fenotipo silvestre de diferentes edades, 5 meses y 10 meses, ya que el déficit conductual y la acumulación de las proteínas patológicas se presenta a partir de los 6 meses de edad en este modelo murino. Los resultados indicaron un incremento únicamente en los niveles extracelulares de DA en los grupos de 5 meses (WT y 3xTg-EA) y WT de 10 meses, confirmando los antecedentes sobre la participación de la DA en procesos de novedad y particularmente en la consolidación de la memoria de

reconocimiento de objetos. Así mismo los ratones de 10 meses de edad son los únicos que presentan un déficit en la memoria de reconocimiento acompañado de la falta de liberación de DA.

Las evidencias de la DA como neurotransmisor importante durante esta tarea conductual y como neurotransmisor que contribuye con la disminución de la formación fibrilar del péptido beta amiloide, lo hacen un buen candidato futuro a complementar los tratamientos en pacientes con la enfermedad de Alzheimer.

I. MARCO TEÓRICO

1.1 Resumen histórico sobre el estudio de la memoria y el aprendizaje.

La naturaleza biológica y la organización psicológica de la memoria han sido investigadas a lo largo del tiempo por filósofos, escritores y científicos, ofreciendo cada uno de ellos un enfoque y su propia vía específica para entenderlo (Eichenbaum, 2003). Sócrates propuso que los humanos tienen cierto conocimiento innato sobre el mundo. Por otra parte la filosofía oriental inició el estudio sobre la memoria con preguntas sobre cómo adquirimos nueva información de nuestro entorno y cómo ésta se almacena para formar la memoria utilizando metodologías no experimentales de introspección y análisis lógico. Sin embargo, con el paso del tiempo esta metodología se fue haciendo insuficiente, y no fue sino hasta el siglo XIX, que el desarrollo experimental en ciencias como la física y la química, desencadenaron un cambio paradigmático de la exploración filosófica hacia el estudio empírico de los procesos mentales, naciendo así la psicología como una disciplina nueva e independiente (Squire & Kandel, 2009).

Psicología conductual

A principios del siglo XIX se comenzaron a formular preguntas sobre el lugar donde se almacena la memoria. Franz Joseph Gall, fundador de la frenología¹, contribuyó con dos marcos conceptuales en base a sus estudios anatómicos, refiriendo al cerebro como el órgano de la *mente*, y proponiendo la idea de la localización cortical, siendo la corteza una parte del cerebro heterogénea, con diferentes centros que controlan funciones específicas y dividiendo el cerebro en 27 partes, cada una destinada a una función psicológica específica, entre ellas, la memoria (Gall, 1835).

¹ Frenología: Doctrina psicológica según la cual determinadas facultades se encuentran localizadas en zonas precisas del cerebro y en correspondencia con relieves del cráneo. El examen de estas zonas, permitiría reconocer el carácter y aptitudes de la persona.

A finales del mismo siglo se desarrolló la psicología, fundamentada en el comportamiento humano y animal. En Alemania Hermann Ebbinghaus decide aplicar el método científico llevando al laboratorio experimentos sobre memoria en condiciones controladas, publicando su trabajo *Über das Gedächtnis (Sobre la memoria)* en 1885. Ebbinghaus midió la retención de trigramas consonante- vocal-consonante (como DAX, BUP y LOC) y relacionó dicha retención con el aprendizaje, de esa manera determinó que existen memorias que pueden ser retenidas durante minutos (efímeras), mientras que existen otras memorias que pueden durar de días a meses (duraderas). Estos trabajos arrojaron por primera vez una descripción de la memoria relacionada con su duración (Anderson, 1995; Ballesteros, 1999; Squire & Kandel, 2009). Años más tarde el filósofo norteamericano William James denominó a aquellas memorias que duraban lapsos cortos de tiempo (minutos-horas) “memorias primarias”, mientras que aquellas que duraban lapsos largos (meses- años) las denominó “memorias secundarias” (Loftus & Loftus, 1976). Los psicólogos alemanes Georg Müller y Alfons Pilzecker, sugirieron que la memoria se consolidaba con el paso del tiempo (Squire & Kandel, 2009), obteniendo de esa manera una visión más amplia sobre el paso de memorias lábiles a memorias más estables mediante el proceso de consolidación que sería retomado años más tarde.

La psicología conductual fue tomando fuerza, y a mediados del siglo XIX Charles Darwin sugirió que así como existen características morfológicas continuas en las especies, las características mentales son similares y de esa manera se podrían utilizar animales para el estudio y la comprensión de las nuestras. Esta sugerencia llevó al fisiólogo ruso Iván Pavlov y al fisiólogo Norteamericano Edward Thorndike a desarrollar modelos animales para el estudio del aprendizaje, esto condujo a Pavlov a descubrir el condicionamiento clásico y a Thorndike a descubrir el condicionamiento operante o instrumental. Este descubrimiento impulsó el uso de animales como modelos para el estudio del aprendizaje y la memoria (Squire & Kandel, 2009).

En el siglo XX, Karl Spencer Lashley relacionó la adquisición y la evocación de la memoria con la extensión de la remoción cortical. Sus procedimientos consistían en observar los efectos que tenía la ablación del cerebro en el comportamiento de las ratas, destruyendo diferentes cantidades de corteza y observando el efecto que esto tenía en el aprendizaje y la retención de la tarea, por medio de pruebas conductuales como laberintos (Goodwin, 2008). Formuló también la ley de la acción de masa en la cual el tamaño de corteza removido, se relaciona con la extensión de la memoria dañada. Esta aseveración fue mejor interpretada y entendida hasta 1949 en *The Organization of Behavior* de Donald Hebb. En dicha publicación, Hebb explicó que existen grupos de células que trabajan juntas para representar información, y que dichos grupos se encuentran distribuidos en la corteza cerebral y de esa manera, al estar distribuidos y a pesar de sufrir lesiones, la información aún podría ser representada, proponiendo que la memoria no se almacena en un solo centro, sino que se encuentra distribuida en diferentes partes del sistema nervioso (Milner *et al.*, 1998).

Los métodos de ablación fueron, por mucho tiempo, los principales para estudiar la memoria. En 1938 el neurocirujano Wilder Penfield sugirió por primera vez que existen aspectos importantes para la memoria que son almacenados en el lóbulo temporal, aseveración que fue resultado de su trabajo con pacientes epilépticos a los que les removía tejido dañado (por lo regular del lóbulo temporal). Años más tarde, en 1957 Brenda Milner describió el caso clínico de un paciente llamado Henry Gustav Molaison, mejor conocido como H. M.; dicho paciente sufría de epilepsia severa y para intentar disminuirla se le removieron estructuras del lóbulo temporal medial, lo que le ocasionó un profundo deterioro en la formación de memorias recientes, denominado amnesia anterógrada, es decir, la incapacidad para poder formar nuevas memorias. H.M. podía registrar la información perceptual adecuadamente, sin embargo no lograba retenerlo por más de 40 segundos, mientras que otras pruebas demostraron que su habilidad sensorial visual podía mejorar a pesar de que no recordara ni estuviera familiarizado con la tarea aplicada, demostrando que existen diferentes sistemas

mnemónicos en el cerebro, afectándose únicamente la memoria de largo plazo (amnesia anterógrada), en conjunto con amnesia retrógrada (“gradiente temporal”). Entre las estructuras temporales que se le removieron al paciente se encontraban: la amígdala, el giro parahipocampal anterior y parte del hipocampo (Hip) (Milner *et al.*, 1998; Hawkins *et al.*, 2006; Peña-Casanova, 2007).

Las metodologías ablativas y la experimentación con la psicología conductual contribuyeron con la clasificación de la memoria de acuerdo a su temporalidad, lo que llevó gradualmente a los investigadores a pensar cómo pasaba de ser una memoria lábil a una memoria que pudiera perdurar mucho tiempo y que contribuyera con la adaptación de los animales a su entorno. Todos los seres vivos se adaptan a su ambiente particular para sobrevivir y evolucionar, estos procesos de adaptación se dan a través de mutación y selección genética, mismos que se hacen visibles a través del comportamiento (Harlow *et al.*, 1971).

1.2 Del aprendizaje a la memoria de corto y largo plazo.

El comportamiento animal puede modificarse mediante el aprendizaje y la memoria, conceptos ampliamente ligados. El aprendizaje se refiere a la adquisición de información o habilidades, mientras que la memoria se refiere al almacenamiento y expresión de dicha información (Thompson, 2000).

La investigación cognitiva en humanos y otros animales mamíferos e invertebrados, ha contribuido con la clasificación de los diferentes tipos de memoria. Richard Atkinson y Richard Shiffrin propusieron en 1968 un modelo de memoria en el que renombraron y relacionaron la memoria de corto plazo (MCP) y la memoria de largo plazo (MLP), proponiendo que la información se almacena como MCP y puede ser mantenida hasta convertirse en MLP mediante el ensayo repetido de la información (Anderson, 1995).

En la década de 1970, se impulsaron estudios genéticos con organismos invertebrados como *Drosophila sp*, el cual dio a conocer que gran parte de las

mutaciones generadas tenían efecto en el aprendizaje, sobre todo en las fases tempranas del condicionamiento olfativo al que eran sometidas. El déficit conductual mostrado se suma a las fallas bioquímicas encontradas en algunas mutaciones, en las que se ven afectadas las cascadas de segundos mensajeros (Dudai, 1989).

La investigación con *Aplysia sp* contribuyó también a describir el mecanismo mediante el cual se almacena la MCP. Eric Kandel utilizó un reflejo defensivo de *Aplysia*, molusco también llamado liebre de mar, en el cual el molusco retira el sifón y la branquia cuando es perturbado con algún estímulo con el cual se le habituaba² y sensibilizaba³ (Squire & Kandel, 2009). En ambos estudios en los que se observaba MCP, se identificó un déficit en la cascada del segundo mensajero adenosín monofosfato cíclico (AMPc), y se descubrió que el rol de las cascadas de segundos mensajeros es importante para la plasticidad conductual mediante la fosforilación⁴ de proteínas ya existentes y de canales iónicos que permiten la entrada de iones como Ca^{2+} y K^+ (Fig.1) (Dudai, 1989; Milner *et al.*, 1998; Squire & Kandel, 2009).

La información que se adquiere del entorno puede ser fácilmente olvidada, por lo que requiere un proceso de estabilización para conservarla a largo plazo, este proceso se denomina consolidación (Dudai, 2004). Al proceso de consolidación se le atribuye plasticidad sináptica duradera en determinados conjuntos neuronales, característica dada por la síntesis de proteínas mediante la activación de uno o más receptores a neurotransmisores. (Ramírez-Amaya, 2007). En 1963 Bernard Agranoff, Samuel Barondes y Larry Squire comprobaron, mediante la inyección de un inhibidor de síntesis de proteínas en ratas sometidas

² Habituaación: Cambio que conlleva a una reducción en la respuesta producida por un estímulo.

³ Sensibilización: Cambio que produce un aumento en la respuesta producida por un estímulo.

⁴ Inserción de un grupo fosfato a una proteína, alterando su carga y conformación, provocando una alteración en su actividad.

a la prueba conductual del laberinto en forma T, que la síntesis de proteínas es necesaria para la formación de MLP pero no para la MCP, ya que únicamente las ratas inyectadas con el inhibidor no presentaron MLP. Los experimentos realizados con *Aplysia* en 1970 y 1980 contribuyeron con el descubrimiento de proteínas y genes implicados en la formación de la MLP. Se extrajeron las células que participan en el almacenamiento de la memoria en este modelo y se colocaron en cultivo, utilizaron el método de potenciación a largo plazo⁵ (PLP) mediante la adición de serotonina y observaron que cuando la potenciación era a corto plazo (una sola aplicación de serotonina, PCP) no requería síntesis de proteínas, mientras que para el PLP sí requería síntesis de nuevas proteínas. Posteriormente Roger Tsien y Brian Bacskai, mediante una técnica de fluorescencia durante el PLP y PCP, observaron la traslocación⁶ de unidades catalíticas del cAMP al núcleo únicamente durante el LTP. La translocación de subunidades catalíticas al núcleo regula los genes CREB-2 y CREB-1, lo que en conjunto promueve la expresión de genes tempranos y la activación de un regulador de la transcripción denominado C/EBP, que promueve el incremento de conexiones sinápticas a través de la síntesis de proteínas (Fig. 1) (Bacskai *et al.*, 1993; Squire & Kandel, 2009).

⁵ Potenciación a largo plazo: incremento en la actividad pre-sináptica y post-sináptica que puede durar de horas a días. En el experimento realizado por Piergiorgio Montarolo, Castellucci, Schacher, Philip Goelet y Eric Kandel agregaron serotonina a los cortes cerebrales para producir PCP, PLP e inhibieron con anisomicina la síntesis de proteína afectando únicamente la PLP.

⁶ Traslocación se refiere al movimiento que realiza una molécula, usualmente proteínas, del citoplasma hacia el núcleo durante una cascada de señalización intracelular en la que el fin es que dicha molécula actúe como represor o activador del proceso de transcripción.

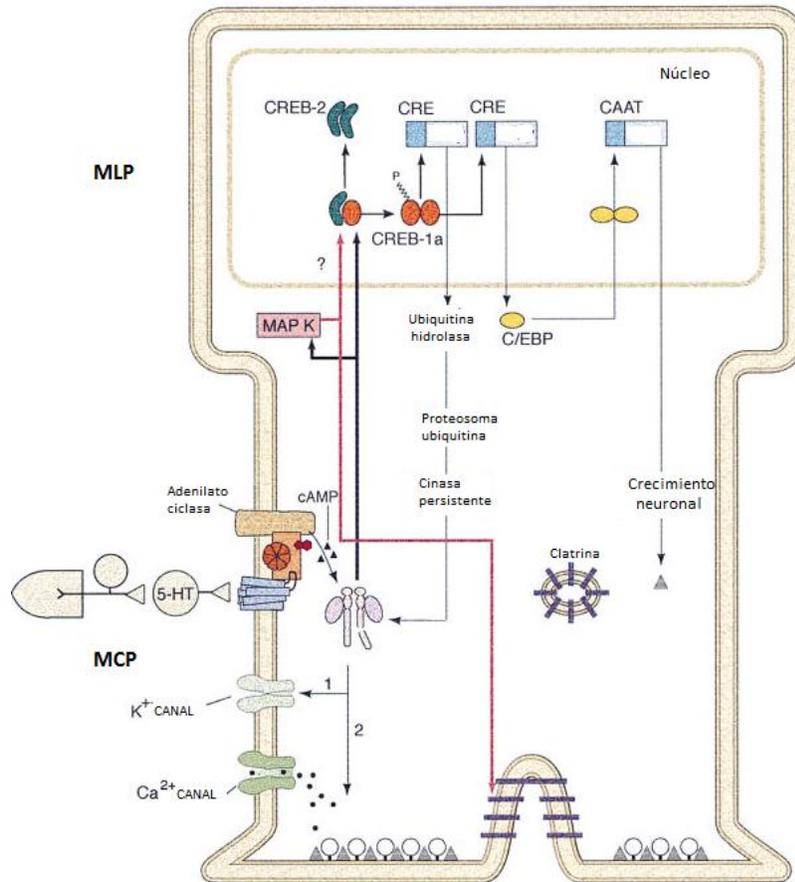


Fig. 1 Representación esquemática de los cambios moleculares durante la memoria de corto plazo (MCP), parte inferior de la imagen, en donde se muestran canales de Ca^{2+} y K^{+} (1 y 2) que implican modificaciones covalentes a proteínas preexistentes; mientras que en la parte superior de la imagen se muestra la memoria de largo plazo (MLP), que implica modificaciones más amplias como la activación de la proteína adenilato ciclasa y de una vía de comunicación por medio de fosforilaciones mediante proteínas cinasas que llegan hasta el núcleo y activan genes tempranos como CRE y genes que pueden promover el crecimiento neuronal como CAAT (modificado de Milner *et al.*, 1998).

1.3 Memoria de reconocimiento

La MLP se puede dividir también en dos tipos: memoria declarativa o explícita y memoria no declarativa o implícita (Fig. 2). La *memoria declarativa* o *explícita* en general se refiere a recordar hechos y eventos (“saber qué, cuándo y dónde”), mientras que la *memoria no declarativa* o implícita se refiere a habilidades que se posean (“cómo hacerlo”) y se observan algunos ejemplos en su

división: procedimientos (que incluye hábitos), priming⁷, condicionamiento clásico simple (respuestas condicionadas a un estímulo previo) y aprendizaje no asociativo (como los reflejos) (Breedlove *et al.*, 2007; Milner *et al.*, 1998). La memoria declarativa se clasifica a su vez en memoria semántica, referida a los atributos para el almacenamiento de conceptos y datos; y en memoria episódica, referida al almacenamiento de hechos y eventos, saber “¿qué?”, “¿dónde?” y “¿cuándo?” ocurrió un hecho o evento, asociando información visual, espacial y temporal (Carrillo-Mora, 2010a; Carrillo-Mora, 2010b)

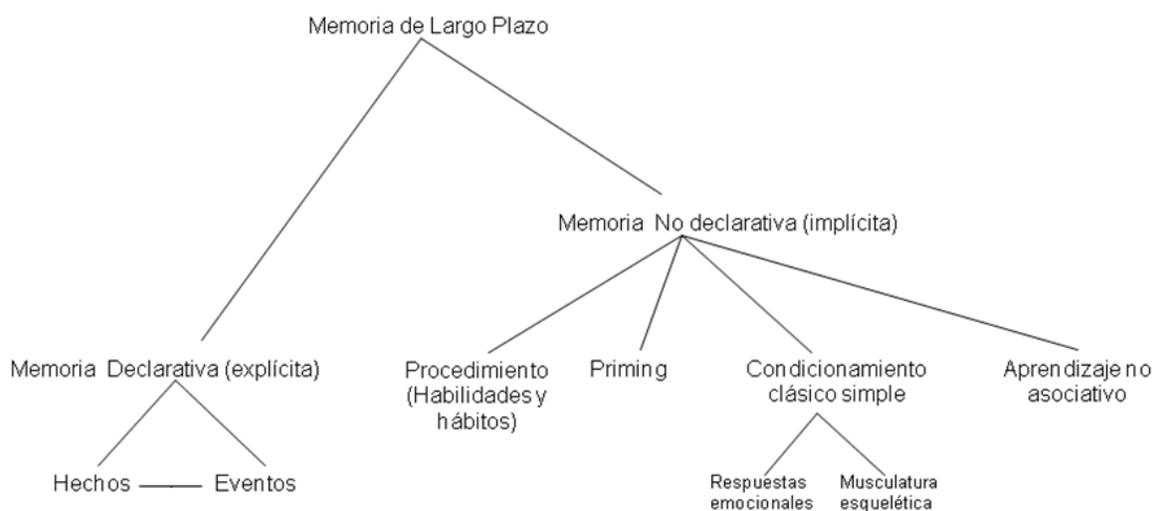


Fig 2. Sistemas de memoria en mamíferos desarrollado por Squire. (Modificado de Milner *et al.*, 1998)

La memoria de reconocimiento es un componente importante de la memoria declarativa o explícita y requiere la capacidad para identificar si un evento se ha experimentado con anterioridad, o si un estímulo ha sido experimentado previamente (Winters *et al.*, 2008; Brown & Aggleton, 2001). Este tipo de memoria se puede aplicar a todos los estímulos que recibimos de nuestro entorno como un

⁷ Priming: El sujeto recupera el material presentado previamente durante el experimento. Un ejemplo es usar preferentemente una palabra que ha sido escuchada recientemente.

rostro, un sabor, un sonido, un olor o un objeto. Gracias a esta capacidad explícita de reconocer estímulos externos a pesar de haber sido expuestos en relativamente pocas ocasiones, se desarrolló la prueba de memoria de reconocimiento de objetos, siendo ésta de gran utilidad para el estudio de la memoria declarativa, incluyendo procesos de adquisición de la información y de familiaridad de los estímulos (Winters *et al.*, 2008).

A partir de la descripción del caso H. M. y de la amnesia anterógrada por la que se caracterizó, se dio a conocer que también su memoria de reconocimiento se veía afectada (Milner *et al.*, 1998). Al desarrollarse experimentos de remoción de estructuras cerebrales en animales similares a las del caso H. M., se descubrió que para que la memoria de reconocimiento funcione se requieren dos sistemas cerebrales: el sistema hipocampal y el sistema perirrinal, el primer sistema mencionado, está relacionado con la información espacial/contextual y estímulos nuevos en un contexto particular, mientras que el segundo responde ante estímulos relacionados con la familiaridad y novedad de algún objeto, sin darle relevancia al contexto en el que fueron expuestos. El sistema hipocampal incluye al giro dentado, subículum y cuerno de Ammon que va de CA1-3, mientras que el sistema perirrinal incluye la corteza perirrinal en las áreas de Brodmann 35 y 36 (Fig. 3) (Brown & Aggleton, 2001). Ambos sistemas tienen relación con otras estructuras del lóbulo temporal medial como áreas subcorticales y lóbulos parietal, frontal y temporal (Winters *et al.*, 2008).

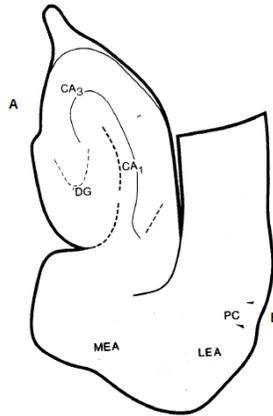


Fig. 3 a) Sistema hipocampal (DG: giro dentado, CA1-3: cuerpo de Ammon) b) sistema perirrinal incluye la corteza perirrinal, PC, junto a la corteza entorrinal lateral y medial (MEA y LEA) (Modificado de Witter *et. al.*, 1989).

Posteriormente se asoció la memoria de reconocimiento de objetos (MRO) con otra estructura del lóbulo temporal importante en el procesamiento de memorias: la corteza insular (CI) (Fig 4). Mediante la inyección de un antagonista de receptores muscarínicos en esta corteza, inmediatamente después de la adquisición de la tarea de reconocimiento de objetos, se ocasionó un déficit en la MLP en ratas, es decir, se afectó la consolidación de dicha tarea (Bermúdez *et al.*, 2005). Años más tarde, se realizó un experimento en el que se administró anisomicina, un inhibidor de síntesis de proteínas, inmediatamente después de la adquisición de la MRO en diferentes áreas cerebrales de importancia mnemónica como la corteza perirrinal, corteza insular, hipocampo y amígdala basolateral, teniendo únicamente efecto sobre la consolidación de la MLP en corteza perirrinal y CI (Balderas, *et al.*, 2008).

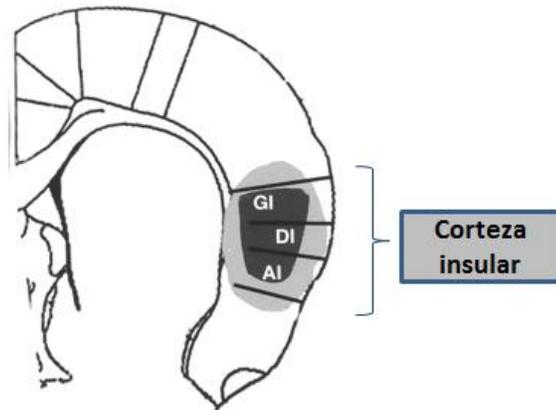


Fig. 4 Estructura de la corteza insular, en mamíferos con granularidad se divide en: corteza insular granular (GI), disgranular (DI) y agranular (AI) (Butti & Hof, 2010) (Imagen modificada de Berman *et al.*, 2000).

1.4 Paradigma de reconocimiento de objetos

El paradigma de reconocimiento de objetos (RO) es una tarea en la cual un estímulo es presentado por una sola vez y se basa en la exploración espontánea de los roedores hacia los objetos (Ennaceur & Delacour, 1988). Esta tarea implica que cuando una rata o ratón son expuestos a un objeto familiar y a un objeto novedoso, pasarán más tiempo explorando el objeto nuevo que el familiar, indicando que el objeto familiar ya está registrado en su memoria (Ennaceur, 2010). Esta tarea no requiere muchas fases de entrenamiento y se lleva a cabo en una caja a la que es previamente habituado el roedor. Se introducen 2 objetos idénticos (O1 y O2), fase denominada “adquisición” (ADQ), durante un tiempo limitado que va de 5 a 10 minutos y después de 90 min (MCP) ó 24 horas (MLP) el roedor es expuesto a una copia del objeto previamente mostrado (Objeto familiar: OF) y un objeto novedoso al que jamás ha sido expuesto (ON), fase denominada “prueba” (Fig. 5) (Ennaceur & Delacour, 1988; Ennaceur, 2010; Winters *et al.*, 2008; Balderas *et al.*, 2008).

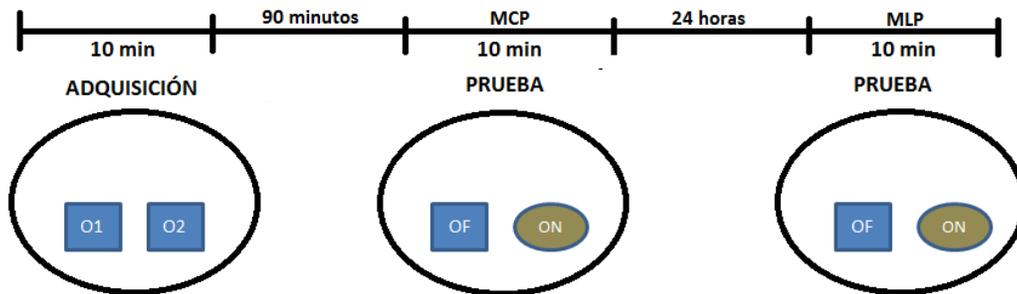


Fig. 5 Esquema del protocolo conductual de reconocimiento de objetos, se muestran las tres fases: Adquisición (ADQ), en donde el roedor se expone 10 minutos a dos objetos iguales (O1 & O2); Prueba de MCP, se realiza 90 minutos después de la ADQ se expone durante 10 minutos a dos objetos, uno familiar y uno novedoso; y por último la fase de Prueba de MLP: 24 horas posteriores a la ADQ se expone al animal a dos objetos, uno familiar y uno novedoso.

1.5 Sistemas neuroquímicos y memoria de reconocimiento

En 1911 Santiago Ramón y Cajal, neuroanatomista español, realizó estudios histológicos aplicando tinciones de cortes cerebrales con nitrato de plata. El análisis microscópico de dichos cortes lo llevó a observar la estructura de la neurona e introducir una teoría, en la cual se sugiere que el sistema nervioso (SN) se encuentra hecho de neuronas, cada una de las cuales es una unidad anatómica y funcional. Contemporáneamente Charles Sherrington definió el término de “sinapsis” como el sitio de interacción entre neuronas de todo el SN, y el fisiólogo alemán Amil Du Bois- Reymond, sugirió que la conducción nerviosa se lleva a cabo mediante corrientes eléctricas, mientras que varios farmacólogos y bioquímicos como Otto Loewi, David Nachmansohn, John Langley y Henry Dale entre otros, demostraron que existen sustancias químicas utilizadas por las neuronas para comunicarse y regular diversas partes del SN (Dudai, 1989). La manera más común de comunicación neuronal es mediante transmisión química. Dicha transmisión se compone de una célula pre- sináptica y una post- sináptica ampliamente reguladas por medio de los siguientes cinco pasos (Siegel *et al.*, 2006):

1. La síntesis del neurotransmisor se lleva a cabo en la terminal nerviosa pre-sináptica.
2. El almacenamiento del neurotransmisor se lleva a cabo en vesículas secretoras.
3. Existe una liberación regulada del neurotransmisor al espacio sináptico entre la neurona pre y post sináptica.
4. Presencia de receptores específicos al neurotransmisor en la membrana post- sináptica.
5. Tiene mecanismos para finalizar la acción del neurotransmisor liberado.

Los neurotransmisores que se liberan y contribuyen con la comunicación sináptica, se sintetizan en áreas específicas y con diversos precursores, de esa manera la estructura sináptica es compleja y comprende varios tipos de sistemas: *colinérgico* (acetilcolina); *amino ácidos* como glutamato, aspartato, GABA y glicina; *sistema de serotonina* (5-HT); de *catecolaminas* como la dopamina, epinefrina y norepinefrina; péptidos como la sustancia P o las encefalinas; entre otras moléculas como purinas, cannabinoides y óxido nítrico (Smith, 2002).

1.5.1 GABA y Glutamato

El *glutamato* (GLUT) es el aminoácido excitatorio más ampliamente distribuido en el sistema nervioso central, ya que alrededor del 90% de las neuronas en el cerebro usan glutamato como neurotransmisor y por su uso extenso y continuo es que se consume gran cantidad de glucosa en el cerebro (como veremos adelante, la *glucosa* es esencial para la síntesis del GLUT). Este neurotransmisor se une a receptores ionotrópicos⁸ como el *ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazole propiónico* (AMPA, por sus siglas en inglés), *kainato* (KA) y *N-metil-D-aspartato* (NMDA por sus siglas en inglés); como a receptores

⁸ Canales iónicos regulados por ligando, regularmente tienen 4-5 dominios transmembranales.

metabotrópicos⁹ de los cuales existen 8 tipos: *mGluR1- mGluR8*. Estos receptores se dividen en tres grupos de acuerdo a su proceso de señalización intracelular: el grupo I *mGluR* aumenta la actividad de la fosfolipasa C y la concentración de Ca^{2+} , este grupo incluye a los receptores *mGluR1* y *mGluR5*; mientras que los grupos II y III *mGluR* se caracterizan por la inhibición de la adenilato ciclasa, el grupo II incluye a los receptores *mGluR2* y *mGluR3*, y el grupo III a los receptores *mGluR4*, *mGluR6*, *mGluR7* y *mGluR8* (Smith *et al.*, 2002, Siegel *et al.*, 2006). El GLUT es sintetizado a partir de la *glucosa* y otros derivados, principalmente el *α-cetoglutarato*, producido en el ciclo de Krebs, al que le es transferido un grupo amino para obtener como producto final GLUT (Fig. 6) (Siegel *et al.*, 2006).

El ácido gamma aminobutírico (GABA) es un aminoácido inhibitorio que se encuentra en el SNC de vertebrados e invertebrados. Las terminales gabaérgicas se encuentran principalmente distribuidas en retina, cerebelo, corteza cerebral, hipocampo, tálamo, bulbo olfatorio y ganglios basales (Smith, 2002). Se han descrito dos tipos de receptores: ionotrópicos, $GABA_A$ y $GABA_C$, que al ser activados permiten la entrada de Cl^- ; mientras que $GABA_B$ pertenece a los receptores metabotrópicos heterodímeros con dos subunidades R1 y R2 (Siegel *et al.*, 2006). Tanto GLUT como GABA tienen como precursor principal a la *glucosa* y al *α-cetoglutarato*. El GLUT es precursor próximo de GABA, éste es sintetizado por la acción de la enzima *descarboxilasa del ácido glutámico*, que actúa sobre el GLUT directamente (Fig. 6) (GAD, por sus siglas en inglés) (Siegel *et al.*, 2006).

⁹ Receptores acoplados a proteínas G con 7 segmentos transmembranales.

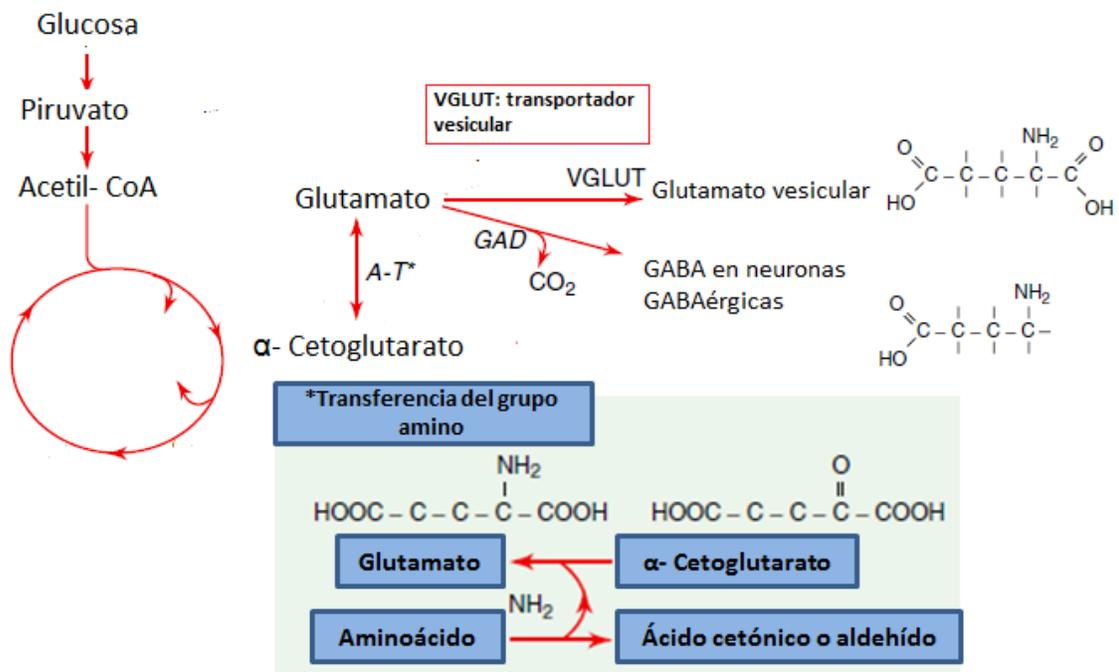


Fig. 6 Síntesis de glutamato y GABA a partir del precursor α -cetoglutarato proveniente del ciclo de Krebs, éste sufre una transferencia del grupo amino (A-T*) para formar glutamato, que pasa a ser glutamato vesicular (VGLUT). Por último la formación de GABA en neuronas se da por medio de la descarboxilación del glutamato por medio de la descarboxilasa del ácido glutámico (GAD) en neuronas GABAérgicas (Modificado de Siegel *et al.*, 2006).

Los procesos celulares y moleculares de la memoria de largo y corto plazo se pueden monitorear por medio de técnicas cada vez más específicas como la microdiálisis, que ha permitido monitorear áreas corticales e hipocampales durante tareas de reconocimiento espacial, de sabores, o de objetos. Giovannini y colaboradores (2001) monitorearon los efectos que tiene la exploración de un ambiente novedoso, en la corteza prefrontal e hipocampo, mediante microdiálisis en libre movimiento. De esa manera se observó que ni el neurotransmisor GABA ni GLUT tienen un incremento significativo en ninguna de las dos estructuras durante la exploración de un ambiente novedoso; sin embargo observó lo contrario al monitorear acetilcolina, neurotransmisor que presentó aumento con respecto a los niveles basales en ambas estructuras.

Los receptores glutamatérgicos metabotrópicos del tipo I y II se consideran importantes en corteza perirrinal durante la adquisición de la MRO (Barker *et al.*, 2006), y se ha reportado en esa misma estructura que un antagonista de los receptores ionotrópicos NMDA y AMPA ocasiona un deterioro en distintas etapas de la tarea de RO como la adquisición, evocación y consolidación (Winters & Bussey, 2005). Por lo tanto el GLUT participa en la corteza perirrinal mediante estos receptores; sin embargo, no se sabe el papel que puede tener el GLUT en la CI durante la adquisición de dicha tarea.

1.5.2 Norepinefrina y dopamina

La dopamina (DA) y la norepinefrina (NE) son dos neurotransmisores que comparten un grupo catecol¹⁰ en su estructura, por lo que se denominan catecolaminas (Smith, 2002). Son sintetizadas a partir del aminoácido esencial *L-Tirosina* en la misma ruta de biosíntesis. La síntesis de dopamina se lleva a cabo por la acción de la enzima *tirosina hidroxilasa (TH)* la cual agrega un grupo *-OH* a la estructura de la *L-Tirosina*, convirtiéndola en *L-DOPA (3,4- dihidroxi-L-fenilalanina)*, en el paso siguiente la enzima *DOPA descarboxilasa* le quita un grupo carboxilo al *L-DOPA* para obtener la DA, esta parte es llevada a cabo en el citoplasma (Fig. 7). Posteriormente en las vesículas secretoras y siendo la DA el precursor próximo de la NE, la enzima *dopamina β-hidroxilasa* le añade un grupo hidroxilo (Fig. 7) (Siegel *et al.*, 2006; Kandel *et al.*, 2000). Los receptores a DA se clasifican en dos tipos: tipo D₁ (D₁ y D₅) que actúan mediante la activación de adenilato ciclasa¹¹; y tipo D₂ (D₂, D₃ y D₄) que actúan inhibiendo adenilato ciclasa (Siegel *et al.*, 2006). Estos receptores se encuentran distribuidos principalmente en hipocampo, corteza cerebral, núcleo caudado, núcleo accumbens e hipotálamo.

¹⁰ Anillo de benceno dihidroxilado en los carbonos 3 y 4, su fórmula química es C₆H₆O₂.

¹¹ Enzima que produce cAMP y PPI a partir de ATP durante la vía de señalización de los receptores acoplados a proteínas G.

Los principales núcleos dopaminérgicos se ubican en el área tegmental ventral (VTA por sus siglas en inglés) y en la *sustancia nigra* (Fig. 8) con proyecciones hacia el cuerpo calloso, cuerpo estriado y corteza frontotemporal entre otras (Purves *et al.*, 2004; Kandel *et al.*, 2000)

Los receptores de NE son receptores adrenérgicos metabotrópicos, clasificados en tres subtipos: α_1 que actúa activando otra vía relacionada a proteínas G, incrementando la actividad de fosfolipasa C y liberando inositol 1,4 trifosfato y diacilglicerol lo que incrementa de manera sinérgica la activación de la proteína cinasa C (PKC) y las concentraciones intracelulares de Ca^{2+} ; α_2 que actúa en una proteína G inhibitoria de adenilato ciclasa, disminución de AMPc y de la actividad de PKA; y por último el receptor β que actúa sobre una proteína G que aumenta la actividad de la adenilato ciclasa, incrementando los niveles de AMPc y la actividad de la PKA (Siegel *et al.*, 2006). El principal núcleo noradrenérgico se encuentra en el *locus coeruleus* (Fig. 8) con proyecciones hacia la corteza cerebral y cerebelo así como a la médula espinal entre otras (Purves *et al.*, 2004; Kandel *et al.*, 2000).

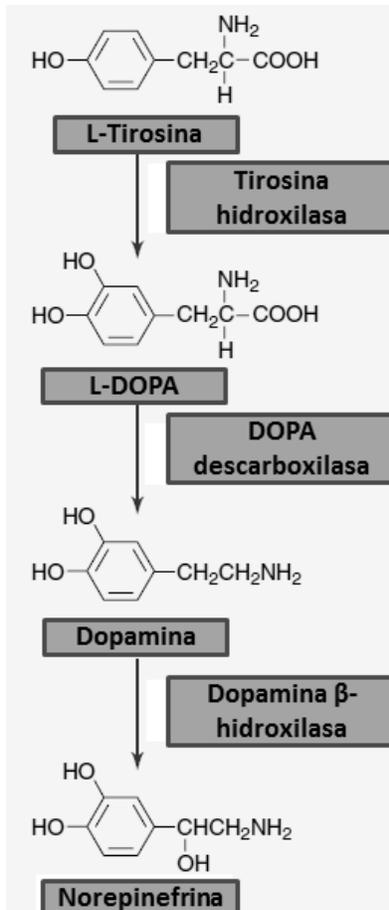


Fig. 7 Ruta de síntesis de las catecolaminas DA y NE a partir de su precursor común, el aminoácido *L-Tirosina* (Modificado de Siegel *et al.*, 2006).

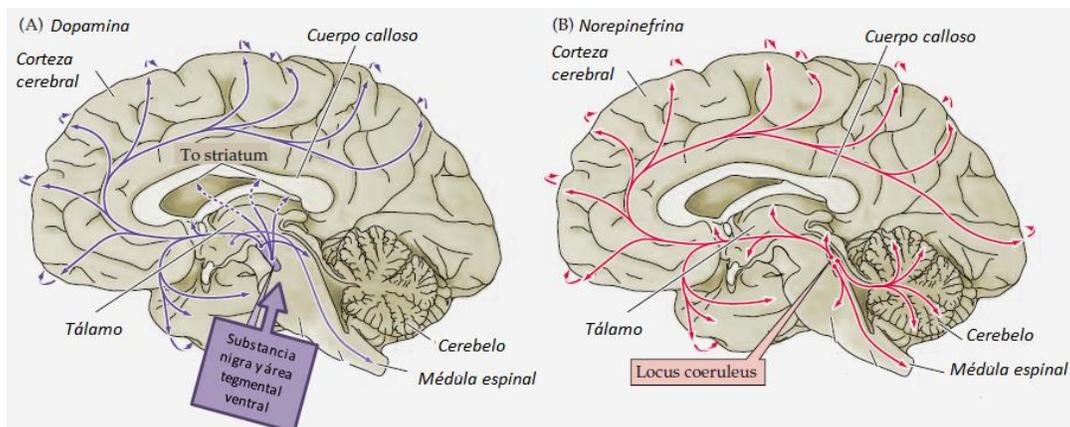


Fig. 8 Áreas de proyección A) Dopaminérgica, que se extiende desde la sustancia nigra y el área tegmental ventral y B) Noradrenérgica, que se extiende a partir del locus coeruleus (Modificado de Purves *et al.*, 2004).

El incremento en la liberación de NE y DA en corteza prefrontal (CPF), se ha relacionado con la presentación de estímulos novedosos, como la exploración de un contexto nuevo (Pudovkina *et al.*, 2001, McQuade *et al.*, 1999). En estos casos el incremento de NE se relaciona con el estrés que pueden tener los animales ante un cambio en su entorno, lo que lo haría novedoso y probablemente estresante.

Particularmente en el reconocimiento de objetos se ha reportado que la activación noradrenérgica en la amígdala basolateral regula la consolidación de la MRO (Roosendaal *et al.*, 2008), mientras que la DA es un neurotransmisor que contribuye tanto en la fase de adquisición, como en la de evocación del RO en CPF a través de la actividad del receptor D1 que, se sabe, inicia cascadas de señalización intracelular de ERK1/2, finalizando con la síntesis de proteínas y la formación de MLP (Nagai *et al.*, 2007).

Existe una relación estrecha entre la DA y la memoria de reconocimiento de objetos. La inyección intraperitoneal (i.p.) de un agonista de los receptores D1 aumenta la exploración del objeto nuevo en la tarea de RO, sugiriendo una red de conexiones corticales entre la corteza perirrinal y prefrontal con el hipocampo, en donde los receptores D1 se requieren en un determinado tiempo durante el aprendizaje de los objetos (Hotte *et al.*, 2005). Así mismo la inyección en la CPF ventromedial de un antagonista de los receptores D1 durante la MRO no permite la consolidación de la tarea (Maroun y Akirav, 2009), mientras que un agonista i.p. de ese mismo receptor aumenta la exploración del objeto nuevo en la MLP, por lo que se sugiere la participación de la dopamina en la consolidación de la MRO (Martins de Lima *et al.*, 2010).

1.6 Enfermedad de Alzheimer (EA)

La EA es una enfermedad neurodegenerativa progresiva e irreversible, y la causa más común de demencia en la población de edad mayor (Czech *et al.*, 2000; Oddo *et al.*, 2003b). Fue descrita detalladamente por primera vez en 1906 por el psiquiatra alemán Alois Alzheimer en una mujer de 50 años de edad que desarrolló trastornos de la memoria y deterioro progresivo de múltiples funciones cognitivas que la llevaron a la muerte (Squire *et al.*, 2008).

En general, la EA conduce a un déficit cognitivo, usualmente manifestado con el deterioro de la memoria, regularmente se manifiesta con el detrimento de la memoria episódica durante la fase inicial de la enfermedad, los enfermos muestran déficit en el reconocimiento de imágenes, palabras, objetos y nombres, así como una disminución de la activación de áreas del lóbulo temporal (Johnson *et al.*, 2006; Ries *et al.*, 2009; Grönholm *et al.*, 2010). Estos deterioros son seguidos de un decaimiento del lenguaje y de alteraciones en la personalidad, así como en el estado de ánimo, eventualmente el paciente pierde la capacidad de realizar tareas simples como la higiene personal, lo que lo lleva a la dependencia social total (LaFerla & Oddo, 2005). En promedio la enfermedad lleva a la muerte 6 años después de la aparición de los primeros síntomas, sin embargo existen individuos que pueden vivir periodos largos que pueden extenderse a 15 años (LaFerla, 2010). La edad es el principal factor de riesgo para la demencia, duplicándose la incidencia de la enfermedad cada 5 años después de los 65 años de edad (LaFerla & Oddo, 2005; Czech *et al.*, 2000) y actualmente afecta a más de 35 millones de personas en el mundo (Diamandis *et al.*, 2011).

La principal característica celular subyacente es la desregulación sináptica que inicia en el hipocampo, seguida de la eventual pérdida de neuronas (Querfurth & LaFerla, 2010). El hipocampo, la neocorteza y la amígdala son las principales regiones afectadas, todas ellas se encuentran implicadas en la memoria y cognición (LaFerla *et al.*, 1995). La pérdida neuronal y posteriormente cognitiva,

se debe principalmente a cambios ultraestructurales que implican la acumulación de placas neuríticas de un péptido fibrilar llamado β -Amiloide y marañas neurofibrilares (MNF) de la proteína tau hiperfosforilada (Selkoe, 2001).

1.6.1 Patología molecular

Existen diversas moléculas y genes que participan en la patogénesis de la EA, entre las que destacan: la proteína precursora amiloide (PPA), el péptido β -amiloide (β A), las secretasas β - y- γ , así como unas proteínas pertenecientes al complejo γ - secretasa llamada presenilina (PS1 y PS2), la proteína asociada a microtúbulos *tau*, así como Cdk5 (cinasa dependiente de ciclina) desregulada junto con sus activadores p35 y p39, además de la apolipoproteína E (apoE) y la sinucleína- α (Chin *et al.*, 2008; Pimplikar *et al.*, 2010). En conjunto con fallas en la liberación de neurotransmisores, desregulación de la dinámica del flujo de Ca^{2+} y alteraciones en la señalización intracelular de la proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK), proteína cinasa C (PKC) y PKA, contribuyen en el desarrollo de la EA y tiene relación con el déficit de memoria tanto en humanos como en modelos animales (Siegel *et al.*, 2006; Chin *et al.*, 2008).

Tau

Es una proteína asociada a microtúbulos (MAP, por sus siglas en inglés), se encuentra presente en mamíferos y contienen dominios de unión a microtúbulos, cercanos al carboxilo terminal (Chin *et al.*, 2008; Dehmelt y Halpain, 2004). Entre sus funciones principales se encuentran la estabilización de microtúbulos, regular el transporte axonal y el crecimiento neurítico, se encuentra presente en el citoesqueleto de células nerviosas aunque también puede encontrarse en células de tejidos periféricos como corazón, riñón, músculo, pulmón, páncreas y fibroblastos (Buée *et al.*, 2000; Williams, 2006).

Tau regula la polimerización de microtúbulos por medio de sitios específicos ubicados en el carboxilo terminal, estos sitios se denominan sitios de unión a microtúbulos y están identificados como los sitios susceptibles de fosforilación por diferentes proteínas cinasas como la GSK3 β y Cdk5. Dichos sitios se caracterizan por ser ricos en serina y treonina (Johnson & Stoothoff, 2004). La mutación o hiperfosforilación de *tau* está implicada en diversos tipos de patologías diferentes a la EA, como lo son la parálisis supranuclear progresiva, demencias frontotemporales, en ocasiones con parkinsonismo asociado al cromosoma 17 o con movimientos anormales prevalentes sobre el deterioro cognitivo, y, por supuesto, está presente en la enfermedad de Alzheimer, en la que suele encontrarse formando filamentos helicoidales apareados (FHAs) o cintas torcidas y filamentos rectos (FR) que en conjunto se denominan marañas neurofibrilares (MNF) (Goedert & Jakes, 2004; Williams, 2006).

Es una proteína altamente soluble, sin embargo en las taupatías, y más particularmente en la EA, se encuentra en un estado insoluble y polimerizado (Fig. 9) (Gamblin *et al.*, 2003). Dicha polimerización es posible mediante la fosforilación de los sitios de unión a microtúbulos, incrementando dicha predisposición al existir mutaciones en el gen *tau* en los exones 9, 10, 12 y 13, estas mutaciones contribuyen que *tau* no se una a los microtúbulos adecuadamente, incrementen su concentración en el citoplasma y, por lo tanto, se agreguen. Sin embargo las taupatías más comunes son las esporádicas, en las cuales existe un aumento en la fosforilación de tau, como ocurre en la EA (Hong *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2001; Goedert, 2004). La EA, es una de las neuropatologías en las que se presenta la acumulación de neurofibrillas o MNF acompañadas de acumulación extracelular de la proteína β -Amiloide.

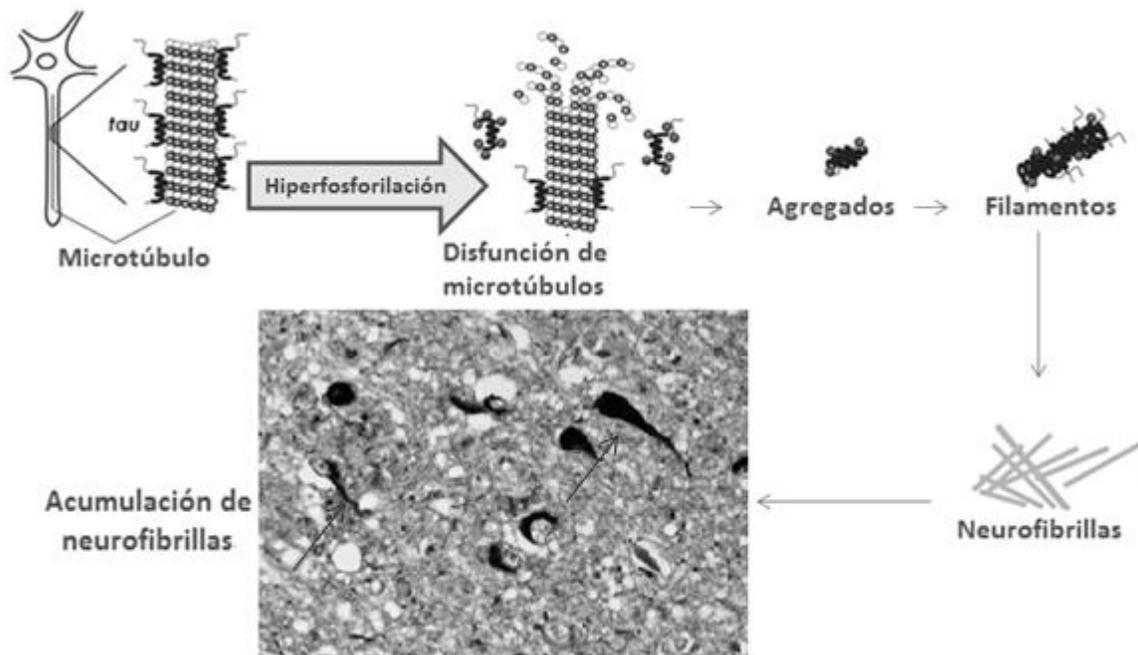


Fig. 9 Agregación de tau, desde la desintegración de microtúbulos hasta la formación de las neurofibrillas y por último una visualización de una técnica inmunohistoquímica para identificar la acumulación de neurofibrillas de tau, las neuronas con acumulación se encuentran señaladas con flechas (Modificada de Medicine world.org: <http://medicineworld.org/news/news-archives/health-news/June-27-2007.html>)

PPA: proteína precursora amiloide

PPA es una proteína de membrana tipo I, cuyo gen se encuentra en el cromosoma 21 y tiene 3 isoformas PPA 770, 751 y 695, este último relacionado en su mayoría con la EA. Se encuentra presente en diversos tipos de células como lo son endotelio, glía y neuronas. Se sabe que participa en diversas funciones celulares cotidianas como procesos de señalización celular, puede actuar como receptor acoplado a proteína G, adhesión celular, transporte axonal, regulación transcripcional, crecimiento de neuritas, sinaptogénesis y regulación de liberación de glutamato (Turner *et al.*, 2003). Un evento metabólico importante de la isoforma PPA695 es su proteólisis, misma que se lleva a cabo en la membrana de la célula, del aparato de Golgi o del retículo endoplásmico, mediante dos vías: una denominada no amiloidogénica, en la que se define la producción de fragmentos

no patogénicos con un primer corte hecho por la secretasa- α , seguida del segundo corte hecho por la γ - secretasa; y otra vía llamada amiloidogénica, en la que la proteólisis se da en principio por una secretasa- β , dando como resultado un fragmento susceptible de ser cortado por la secretasa- γ , para producir fragmentos biológicamente activos denominados péptidos β A principalmente de 40 y 42 aminoácidos (β A-40 y β A-42) (Fig. 10), péptidos de gran importancia en el desarrollo de la EA (Turner *et al.*, 2003; Chin *et al.*, 2008).

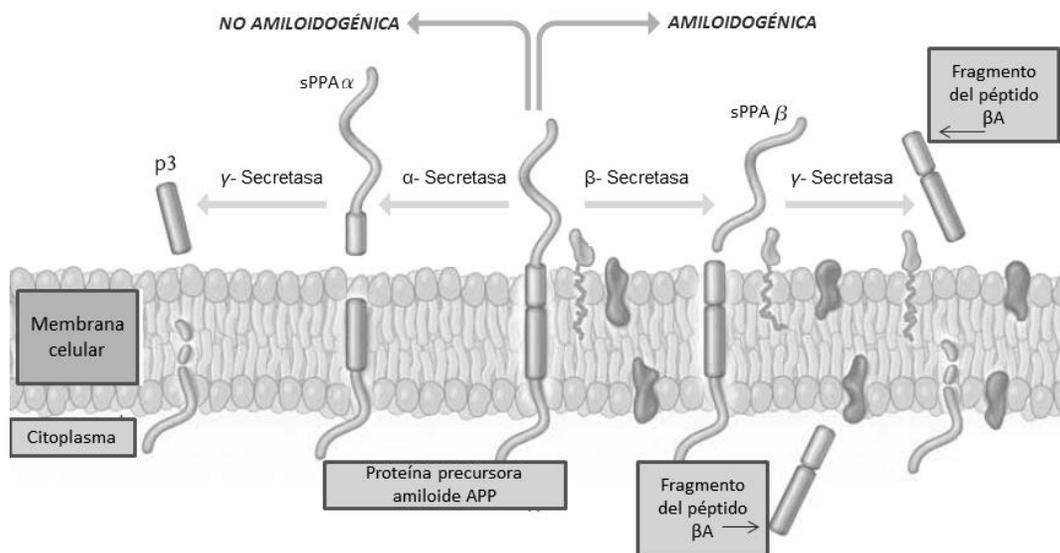


Fig. 10 Rutas de catabolismo de la proteína precursora amiloide PPA, se observan la ruta no amiloidogénica (izquierda), en donde se liberan productos no patogénicos; y la ruta amiloidogénica que genera fragmentos β A 40 y 42 por la acción proteolítica de las secretasas β y γ sobre el APP, siendo un factor patogénico (Modificado de Querfurth & LaFerla, 2010).

Secretasas α , β , γ

Existen varios tipos de secretasas¹² implicadas en el desarrollo de la EA. Las secretasas- α , son proteínas que cortan APP cerca de la membrana, entre la lys613 y leu614, fragmento crítico para la formación del péptido amiloide y liberan una proteína soluble que no permite la formación de los fragmentos β A40/ β A42,

¹² Proteínas que se encargan de cortar específicamente en sitios determinados de otras moléculas.

esta ruta marcada por la secretasa alfa se denomina ruta no amiloidogénica (Fig. 10) (Turner *et al.*, 2003). La *secretasa-β*, también denominada BACE (enzima de corte del sitio β de PPA), es una aspartil proteasa que corta la PPA en el aminoácido 99, derivando en un fragmento βAPP susceptible de ser cortado por la secretasa γ en los residuos 38 y 43. La *secretasa-γ* es también una aspartil-proteasa que se ancla a numerosas glicoproteínas tipo I transmembranales, se forman a partir de las proteínas nicastrina, PEN2, Aph1 y la presenilina 1 ó 2 (PS1, PS2), son el sitio activo de los complejos protéicos formados junto a las secretasas β y α (La Ferla *et al.*, 2007; Woo *et al.*, 2010, Chin *et al.*, 2008). La secretasa-γ corta en el fragmento liberado por la β-secretasa, generando fragmentos βA de diversas longitudes, siendo los más abundantes de 40 y 42 aminoácidos, como parte crucial de la ruta amiloidogénica (Hedskog *et al.*, 2010).

Péptido Beta- Amiloide

Es un péptido que en condiciones normales se une directamente a bicapas lipídicas alterando la fluidez de la membrana. Forma poros que incrementan la permeabilidad de la membrana a iones. Influye en la función de una variedad de proteínas celulares como el receptor nicotínico α7 e integrinas (Chin *et al.*, 2008). Patológicamente se deposita extracelularmente en placas filamentosas y una marca característica patológica es la presencia de lisosomas alargados, numerosas mitocondrias y filamentos helicoidales apareados. La acumulación de placas interrumpe las funciones neuronales, altera las propiedades electrofisiológicas de los circuitos involucrados y ocasiona alteraciones sinaptodendríticas (Chin *et al.*, 2008; Selkoe, 2001). Los fragmentos de βA-42 son más patogénicos que los βA-40, ya que en su forma monomérica son más propensos a oligomerizarse y formar las placas grandes neurotóxicas (Fig. 11) (LaFerla, 2010; Chin *et al.*, 2008; Selkoe, 2001).

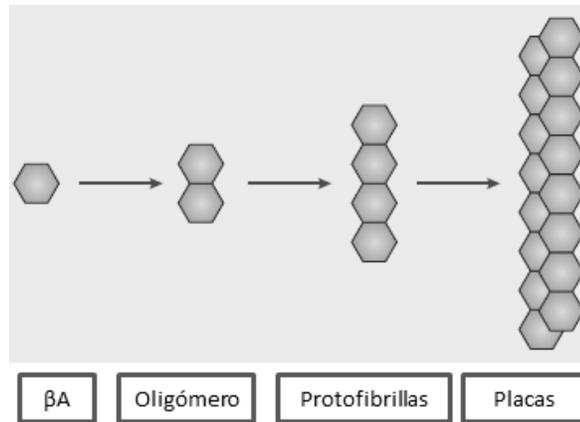


Fig 11. Oligomerización del péptido β A desde su forma monomérica hasta las placas de alto peso molecular patogénicas (Modificado de LaFerla *et al.*, 2007).

Las moléculas descritas son parte fundamental en el estudio de la EA, es por ello que se han desarrollado mutaciones similares a las que prevalecen en familias con la patología y se han realizado modelos transgénicos experimentales.

1.7 Modelo murino 3xTg- EA

Para mejorar la comprensión de la EA, se han implementado técnicas de inserción de transgenes¹³. Para la EA se implementaron modelos murinos que albergan genes humanos codificantes para las proteínas presentes en la patología. Los primeros modelos para Alzheimer contenían desde un sólo transgen hasta el modelo utilizado en el presente trabajo, de tres transgenes humanos. (Oddo *et al.*, 2003b).

Este modelo triple transgénico (3xTg-EA) contiene los genes: PS1_{M146V}, PPA_{Swe} y tau_{P301L}, éstos se encuentran regulados por el promotor Thy 1.2, gracias al cual estos transgenes se expresan exclusivamente en sistema nervioso central

¹³ Técnica de inserción de transgenes: técnica genética en donde un gen previamente clonado es inyectado en el núcleo de un óvulo fertilizado, estos óvulos fertilizados e inoculados son implantados en una hembra receptiva para completar el desarrollo embrionario, por lo que su descendencia contendrá el gen implantado, estableciendo así nuevas líneas genéticas.

(Oddo *et al.*, 2003). El ratón se obtuvo por la microinyección de los genes PPA_{Swe} , τ_{P301L} y el promotor Thy1.2, en un embrión homocigoto¹⁴ de ratones *Knock-in*¹⁵ para el gen $PS1_{M146V}$ ($PS1_{M146V}$ KI) (Fig. 12) (Oddo *et al.*, 2003). El modelo fue probado conductualmente con anterioridad para comprobar que la inserción de los transgenes no afectara otras partes del fenotipo del ratón, como su locomoción o reconocimiento visual (Pietropaolo *et al.*, 2008; Gulinello *et al.*, 2009; Sterniczuk *et al.*, 2010). La caracterización de los ratones transgénicos demostró que presentan acumulación de βA en neocorteza e hipocampo a partir de los 6 meses de edad y siendo éstas estructuras importantes para la memoria, la acumulación del péptido y de la proteína Tau confieren al modelo el característico déficit mnemónico conforme avanza dicha acumulación con la edad (Oddo *et al.*, 2003).

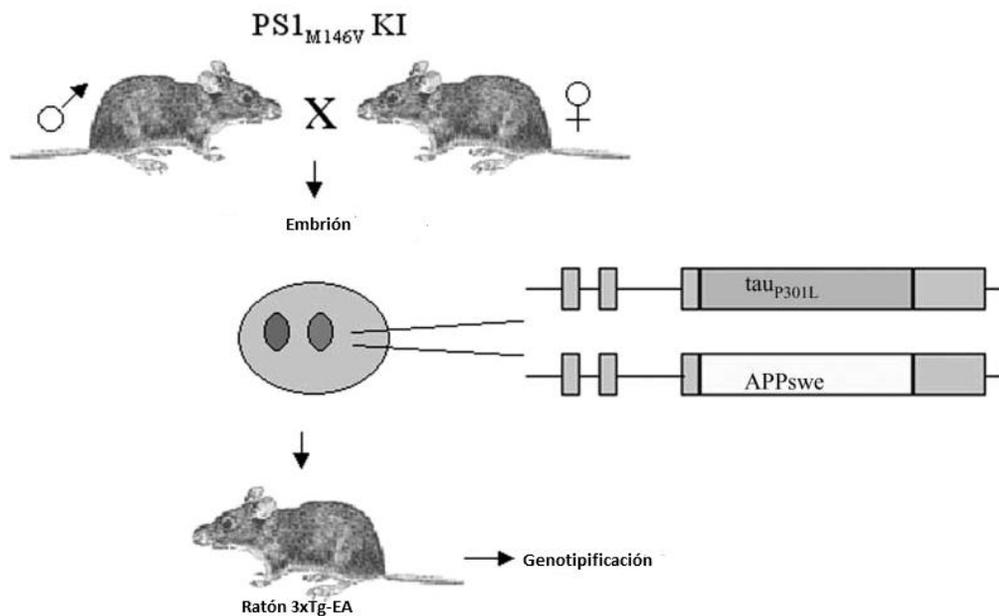


Fig 12. Obtención de un ratón 3xTg- EA. Ratones previamente transfectados con el gen $PS1$ fueron cruzados y el embrión obtenido fue transfectado con los genes APP_{Swe} y τ_{P301L} , y el promotor Thy 1.2 para asegurar que estas proteínas sólo se expresarán en sistema nervioso central (Modificado de Oddo *et al.*, 2003).

¹⁴ Organismo con dos alelos idénticos.

¹⁵ Condición genética en la que un organismo alberga un gene exógeno a su genotipo normal.

Las mutaciones de los genes insertados fueron encontradas, en su mayoría, en familias que presentaban la EA familiar. La mutación PS1_{M146V} es una mutación muy frecuente en la EA, se encontró en familias finesas/suecas a lo largo de 4 generaciones mediante un estudio histopatológico y genético con cerebros y con individuos respectivamente, que en su historia clínica presentaron la EA familiar, encontrando niveles significativamente más altos del péptido β -amiloide (Clark et al., 1995; Hellstrom et al., 2009).

La mutación APP_{Swe} es una mutación que se encontró en dos familias suecas con la EA, con un ancestro común que databa del siglo XVIII, en todos los casos había una estrecha relación entre la mutación en APP y la enfermedad temprana. Se les detectó una doble mutación en el codón 670/ 671 en el amino terminal y se caracteriza por una sustitución de lisina por asparagina y metionina por leucina (Lannfelt et al., 1995).

La mutación tau_{P301L} se encontró en familias de los Países Bajos durante 5 generaciones y en 2 generaciones en los Estados Unidos de Norteamérica con demencia frontotemporal. Es una mutación sin sentido en el exón 10, en la que se cambia la prolina 301 por una leucina (Hong et al., 1998; Ho *et al.*, 2001; Hutton et al., 1998).

El promotor Thy 1.2, está relacionado con la transcripción del RNAm de una glicoproteína de membrana distribuida en todas las regiones del cerebro y médula espinal murinos. Se encuentra presente en la superficie de neuronas y sus dendritas, por lo que también se le ha relacionado con procesos sinápticos (Barclay et al., 1978). Esta característica de presencia exclusiva en sistema nervioso permitió utilizar el gen como promotor de las mutaciones para tau y APP.

1.8 Dopamina y Alzheimer

La descripción e investigación de la disfunción sináptica durante la EA llevaron al descubrimiento de un déficit en el sistema colinérgico y en años más recientes se ha estudiado el déficit del sistema dopaminérgico en pacientes con la enfermedad.

La hipótesis colinérgica sugiere que la pérdida de células colinérgicas, resultado de la neurodegeneración en partes del cerebro basal (Whitehouse *et al.*, 1981), conlleva a bajos niveles de acetilcolina cortical, aunado a la acción de los péptidos solubles de β A sobre los receptores colinérgicos nicotínicos, ya que son altamente afines a la subunidad $\alpha 7$ de estos receptores presinápticos ($\alpha 7$ -nAChRs), inhibiéndolos selectivamente (Dougherty *et al.*, 2003), así como a receptores muscarínicos, mediante los cuales daña la respuesta colinérgica actuando sobre la transducción intracelular (Lanni *et al.*, 2010). Esta información dio como resultado el inicio de tratamientos que implican la administración de inhibidores de la acetilcolinaesterasa¹⁶ como donepezil, rivastigmina y galantamina, cuya acción se refleja en elevar o mantener los niveles de acetilcolina en el espacio sináptico (Schliebs & Arendt, 2006).

Recientemente, las investigaciones han relacionado también a la DA con la EA, argumentando una disminución en la unión de la DA con sus respectivos receptores (Reeves *et al.*, 2009). Pruebas motoras, espaciales y de memoria episódica a voluntarios sanos monitoreados con *PET*¹⁷ indican la participación del receptor D2 en dichas tareas, mientras que en pacientes con la EA se ve afectada tanto la actividad dopaminérgica como el desempeño de las tareas conductuales

¹⁶ Enzima encargada de hidrolizar la acetilcolina en el espacio sináptico.

¹⁷ Positron emission tomography, técnica de escaneo de órganos a través de un trazador que lo permita como una molécula que se une o metaboliza en determinados sitios celulares y tisulares, un ejemplo es la glucosa.

(Reeves *et al.*, 2010). Actualmente, el papel que desempeña la dopamina en la EA es ampliamente estudiado. Se han desarrollado hipótesis sobre el rol de la dopamina en la inhibición de la formación fibrilar del péptido β A (Huong *et al.*, 2010), ya que la administración de levodopa (L-DOPA) en un modelo murino, mejora el desempeño conductual (Ambrée *et al.*, 2007) y la administración crónica de apomorfina (agonista dopaminérgico), disminuye las concentraciones intraneuronales de β A (Himeno *et al.*, 2011). Esto se complementa con los resultados de la inhibición de formación fibrilar por medio de derivados catecolaminérgicos como levodopa, DA, epinefrina y NE, sugiriendo la interacción del anillo catecol con el péptido β A (Huong *et al.*, 2010), esto sugiere que la DA juega un papel importante en la EA y puede ser un blanco terapéutico a futuro.

Fortaleciendo la hipótesis que le otorga importancia médica a la dopamina en la EA, existen experimentos en ratones 3xTg-EA de 9 meses en los que se ha observado un déficit en la liberación de DA al exponerlos a un sabor novedoso, mientras que en animales de 2-5 meses 3xTg-EA y silvestres (WT por sus siglas en inglés), es decir sin las mutaciones, presentan un incremento de casi un 200% en la liberación de DA al presentarles el estímulo gustativo nuevo. Así mismo los ratones de 9 meses 3xTg-EA no muestran neofobia (miedo a sabores nuevos) ante la presentación de sacarina 0.3%, relacionando la ausencia de neofobia con el déficit en la liberación de DA (Guzmán *et al.*, 2011). De igual manera ratones transgénicos con una doble mutación para APP tienen déficit en la tarea de RO y una baja concentración de dopamina en hipocampo y corteza prefrontal, por lo que al administrarles levodopa aumentan la exploración del objeto nuevo en la tarea de RO (Ambrée *et al.*, 2007).

Los antecedentes contribuyen con el argumento de que la DA tiene un rol importante en el procesamiento de la MRO y a su vez podría ser crucial durante la aparición del déficit en la memoria de reconocimiento en individuos con la EA, lo que conduce a explorar y encontrar la participación de la DA en la CI durante la tarea de RO más específicamente.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Uno de los déficits más relevantes en la EA es el que se presenta en la memoria de reconocimiento debido a neurodegeneración en estructuras cerebrales involucradas en este tipo de tareas. Dicha memoria involucra la distinción entre estímulos novedosos y familiares, por ello es probable que los individuos que presentan la EA tengan déficits en los procesos involucrados en la señalización de tareas de reconocimiento, particularmente de RO.

La CI es una estructura importante para el procesamiento de la memoria de reconocimiento de objetos y se ha sugerido que existe un déficit de DA en esta estructura durante el reconocimiento de un estímulo novedoso. De esta manera, es probable que la DA se vea afectada en otra tarea de reconocimiento como la MRO, durante la cual la CI es vital para procesarla y consolidarla. No existen datos acerca de los déficits en el RO de este modelo transgénico ni de la liberación de neurotransmisores en dicha tarea en CI ni en el Hip, que es una estructura principalmente relacionada con aprendizaje espacial.

De tal forma que el estudio de los cambios de liberación que intervienen en la tarea de RO en la CI e Hip tanto en animales WT como 3xTg-EA permitirá comprender las señales de neurotransmisión que conlleva el proceso de aprendizaje *per se*, así como su posible relación con los déficits cognitivos que se desarrollan con la EA.

III. HIPÓTESIS

Los antecedentes indican que la dopamina participa en la MRO, por lo que esperamos observar modificaciones en sus niveles extracelulares durante la etapa de adquisición de la tarea. Además, dado que los pacientes con la EA presentan un deterioro en la memoria de reconocimiento, esperamos observar déficits en la prueba de memoria de los ratones 3xTg-EA de 10 meses, grupo que corresponde

a los ratones que ya han desarrollado la patología y probablemente este déficit cognitivo esté relacionado con la desregulación de la transmisión dopaminérgica.

IV. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el desempeño conductual del modelo murino 3xTg-EA, durante la tarea de reconocimiento de objetos. Así mismo, evaluar la liberación de los neurotransmisores GLUT, GABA, NE y DA durante la adquisición de dicha tarea para determinar si existen cambios en las concentraciones extracelulares en corteza insular y realizar la comparación con una estructura que no está relacionada con el procesamiento de la novedad en dicha tarea, como lo es el hipocampo.

4.1 Objetivos particulares

A. Analizar la conducta del modelo 3xTg- EA durante la fase de adquisición y prueba de MLP en la tarea de RO.

B. Determinar si la presentación de objetos nuevos durante la fase de adquisición genera un cambio significativo en la concentración extracelular de los neurotransmisores de interés.

C. Analizar si existen diferencias y relación entre los cambios en la liberación de neurotransmisores, con respecto al desempeño conductual en ratones WT y 3xTg-EA de 5 meses, así como WT y 3xTg-Ea de 10 meses.

V. METODO EXPERIMENTAL

5.1 Modelo animal

Se utilizaron 25 ratones: 12 WT y 13 de un modelo murino 3xTg-EA. Los 25 ratones se repartieron en 4 grupos por edad y por genotipo (Ver tabla 1).

Tabla 1. Clasificación de animales de estudio

EDAD	TIPO	
	WT	3xTg- EA
5 MESES	6 Ratones	6 Ratones
10 MESES	6 Ratones	7 Ratones

5.2 Operación estereotáxica

Los ratones fueron anestesiados por inhalación con Isoflurano líquido (PiSA, México) y canulados por estereotaxia convencional en Corteza Insular (CI) e Hipocampo (Hip) (Coordenadas CI: AP= +1.1, L= -3.3 y DV= -2.75; Hip: AP= -2.3, L= +1.5 y DV= -1.25, con respecto a Bregma) (Fig. 13) (Paxinos & Keith, 2004). Se les implantó una cánula guía en cada estructura, sujeta con tornillos y se fijaron con acrílico dental. Al finalizar se les realizó antisepsia y asepsia con iodo y se les administró una mezcla de Ketoconazol (GI) y Oxitetraciclina-Polixina B para evitar infecciones. Se dejaron descansar 5 días después de la operación en ciclo luz-oscuridad, en cajas individuales con agua y comida *ad libitum*, todos bajo las mismas condiciones durante todo el experimento.

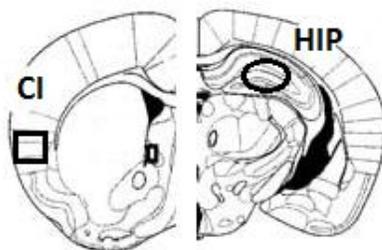


Fig 13. Estructuras en las que se implantó la cánula guía CI, corteza insular (cuadrado); HIP, hipocampo (círculo). (Modificado de Linden *et al.*, 2004).

5.3 Habitación

Finalizando los días de descanso, los ratones fueron manipulados y habituados a las cámaras de microdiálisis (burbujas de acrílico con una base de cartón rodeada de cartulina negra y cubierta por aserrín) durante 10 minutos por 5 días (Fig. 14). Para su habituación se les colocaron collarines de listón de 5 - 8mm de grosor unidos por un gancho de metal a los brazos de microdiálisis para evitar que la tubería de recolección se enredara con el movimiento del animal,

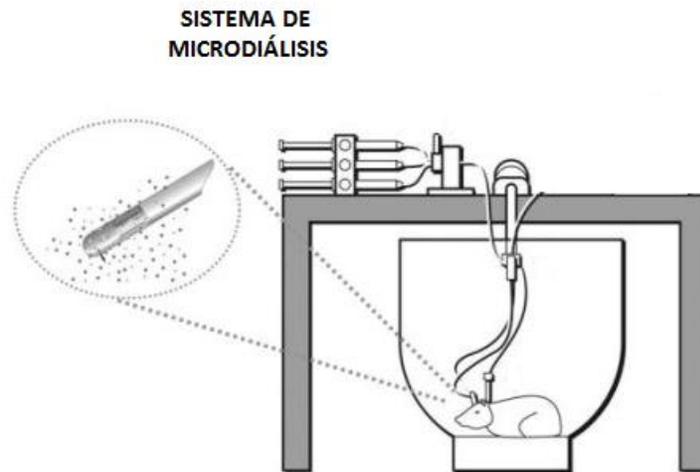


Fig. 14. Sistema de microdiálisis, se puede observar la ubicación del animal dentro de la burbuja de habituación y debajo de la bomba de perfusión (Modificado de Miranda, 2007).

5.4 Microdiálisis en libre movimiento durante la adquisición de la tarea de reconocimiento de objetos

La microdiálisis *in vivo* es una técnica neuroquímica que permite el monitoreo de sustancias neuroquímicas endógenas, metabolitos y neurotransmisores en diferentes regiones cerebrales en animales que se encuentran en libre movimiento, así como la administración continua de compuestos exógenos (retrodiálisis). Consiste en colocar una membrana en la cánula guía, unida a una tubería (entrada) conectada a una bomba de perfusión para perfundir líquido cefalorraquídeo artificial (LCRA). El líquido perfundido internamente se pone en contacto con el medio externo contribuyendo con la

difusión de los metabolitos y sustancias de alta concentración en el espacio extracelular al interior de la membrana, de esa manera el microdializado es recolectado por una segunda tubería (salida) en viales pequeños para posteriormente analizarlo y determinar si existen cambios en la composición extracelular del fluido (Fig. 15) (Siddiqui & Shuaib, 2001; Orłowska, 2004).

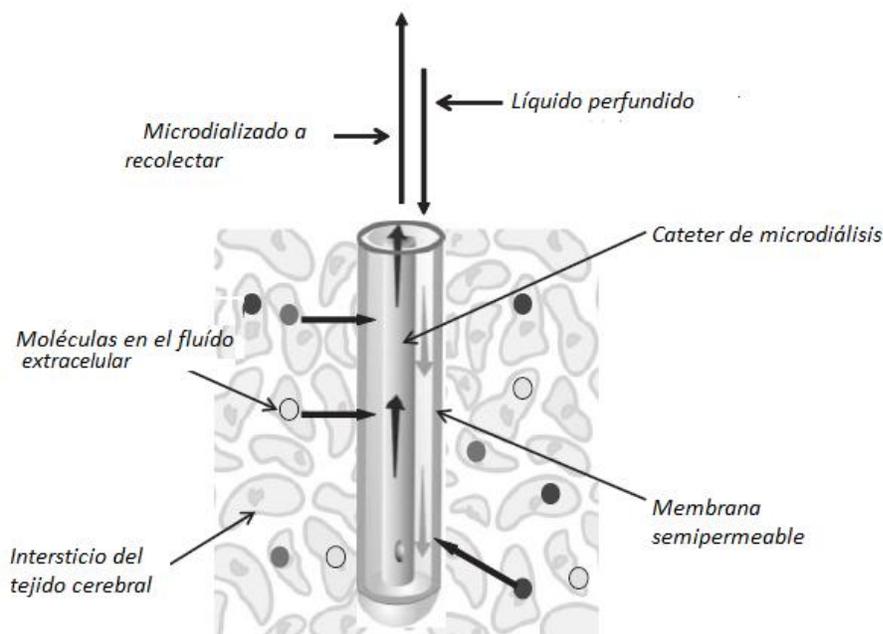


Fig 15. Esquema que representa la membrana de microdialisis en el tejido (Modificado Tisdall & Smith, 2006).

Los ratones fueron conectados a un sistema de perfusión, a una velocidad de $1\mu\text{L}/\text{min}$, perfundiendo LCRA (NaCl 118mM , KCl 4.7mM , KH_2PO_4 1.2mM , MgSO_4 1.2mM y $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, pH 7.4) se dejaron 60 min en estabilización. La microdialisis se llevó a cabo a un flujo de $0.25\mu\text{L}/\text{min}$ para CI y $0.20\mu\text{L}/\text{min}$ para HIP en viales de $200\mu\text{L}$ que contenían $1\mu\text{L}$ de mezcla antioxidante (ácido ascórbico 0.25mM , Na_2EDTA 0.27mM y ácido acético 0.1M). Cada fracción recolectada fue de 16 minutos con un total de 6 fracciones (F1, F2, F3, F4, F5, F6) y se calculó el volumen muerto de acuerdo con la longitud de la tubería para correlacionar con mayor precisión el monitoreo intracerebral con la conducta del animal.

5.5 Protocolo de la tarea de reconocimiento de objetos

Después de la F3 se colocaron dos objetos idénticos en color, tamaño y forma durante 10 minutos (ADQ) y 24hrs después se realizó una prueba para medir MLP, que consiste en volver a colocarles dos objetos pero, en este caso, uno es sustituido al azar, es decir se exponen a un objeto familiar y a uno completamente nuevo y diferente. Se capturó video durante la libre exploración de cada ratón a lo largo de los 10 minutos de cada fase (ADQ y PBA) (Fig. 16).

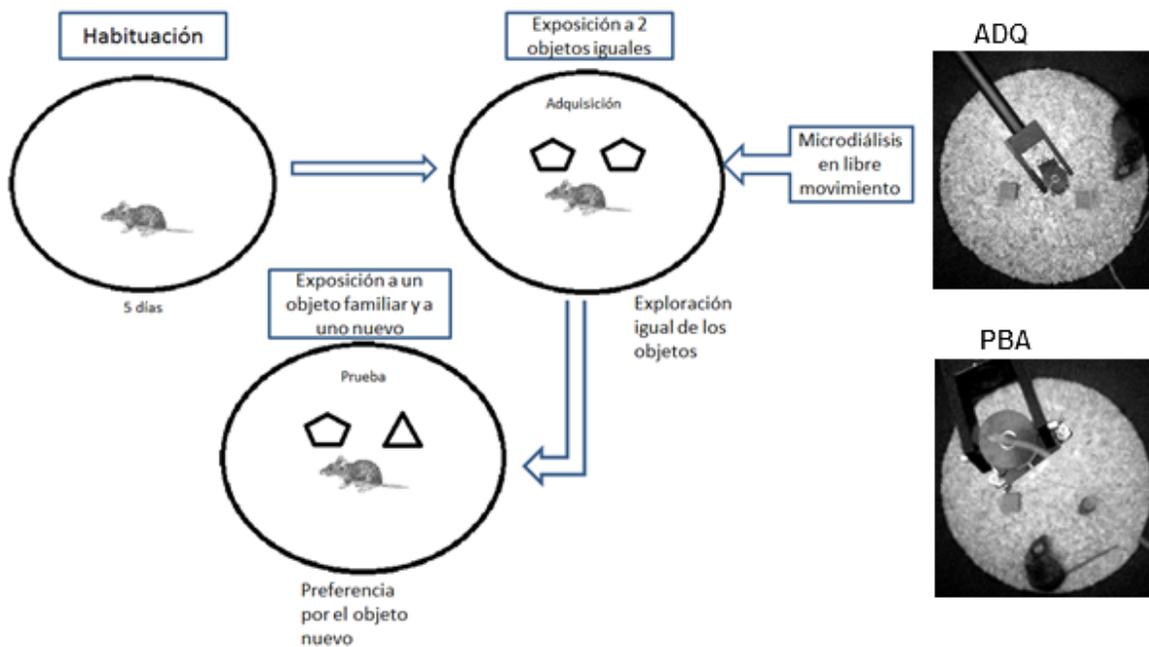


Fig 16. Protocolo conductual de reconocimiento de objetos, con microdiálisis durante la adquisición (ADQ), muestra la prueba (PBA) de memoria de largo plazo cambiando uno de los objetos (objeto novedoso).

Se analizaron los videos minuto a minuto hasta completar los 10 minutos totales. Durante cada minuto se considera la exploración con dos cronómetros, uno por objeto, tomando como exploración el acercamiento con la nariz hacia el objeto por lo menos a 2 cm de distancia o hasta tocarlo. No se considera exploración si el ratón se sube sobre el objeto a menos que su nariz esté dirigida a

2cm o menos cerca del mismo (Ennaceur et al., 1988; Enanaceur, 2010). Para obtener el índice de reconocimiento de objetos (IRO), se toma el tiempo total de exploración de cada objeto y el tiempo total de exploración de ambos objetos, dividiendo el tiempo de exploración de cada objeto entre el tiempo total se obtiene el índice de reconocimiento de cada uno (Ennaceur, 1988) (Ver tabla 2).

Tabla 2. Operaciones para la obtención del IRO.

Adquisición	Prueba
<ul style="list-style-type: none"> • Tiempo total O1 + Tiempo total O2= Tiempo total de exploración. • $IRO\ O1 = T\ total\ O1 / T\ total\ de\ exploración$ • $IRO\ O2 = T\ total\ O2 / T\ total\ de\ exploración$ 	<ul style="list-style-type: none"> • Tiempo total OF + Tiempo total ON= Tiempo total de exploración. • $IRO\ OF = T\ total\ OF / T\ total\ de\ exploración$ • $IRO\ ON = T\ total\ ON / T\ total\ de\ exploración$

5.6 Análisis de muestras

5.6.1 Derivatización

Es una reacción en la cual un fluoróforo se une a moléculas con un grupo amino primario en presencia de un grupo nucleofílico (CN-) y requiere de calor para desencadenarse. Se colocaron 10µL (100nmol) del agente fluorogénico FQ (3-(2-Furoil) quinolina-2-carboxaldehído) desecado al vacío, 6µL de metanol, 1µL de KCN (25 mM) y 2µL de estándar interno (EI) (1mg/mL, disuelto 1:100 equivalente a 0.075mM de O-metil-L-Treonina), más el volumen de muestra recuperada durante la microdiálisis, que oscilaba entre los 4 y 5µL. Para iniciar la reacción de unión de los neurotransmisores y el EI al FQ se incubaron 15 minutos a 65°C en un baño termostático multi-bloques (Lab-Line instruments) en oscuridad.

5.6.2 Electroforesis Capilar

El análisis cuantitativo se llevó a cabo mediante electroforesis capilar (EC), una técnica analítica de separación de moléculas. Emplea capilares de sílica fundida (Beckman Coulter) con diámetros que van de entre 20- 200µm para dar

una gran eficiencia en la separación de los analitos. El sistema, consiste en un abastecedor de alto voltaje de 0- 30kV, un capilar SiO₂, dos depósitos de amortiguador de corrida, dos electrodos y un detector en columna (Fig 17). La separación se realiza mediante la aplicación de voltajes que generan un flujo electro-osmótico y electroforético de amortiguadores dentro del capilar (Xu, 1996).

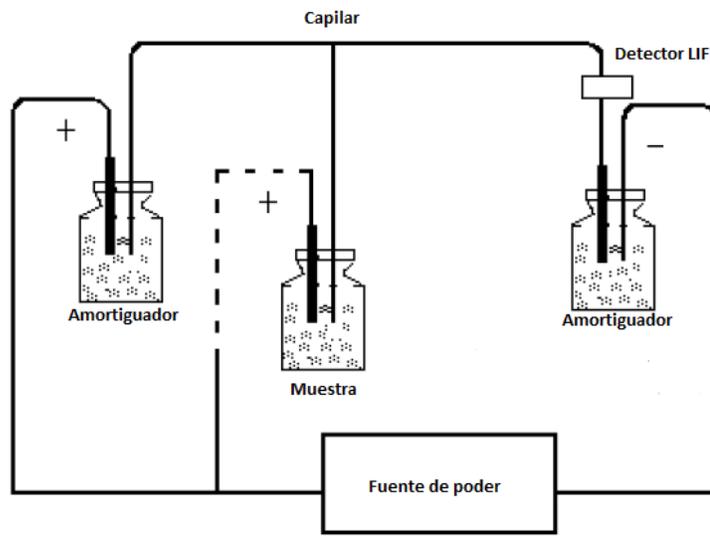


Fig 17. Esquema del sistema de EC, se muestra la fuente de poder para la administración de energía, el amortiguador de corrida y la muestra que pasa por el capilar separándose y al final es detectado y enviada la señal para generar los electroferogramas (Modificado de Xu, 1996).

La separación de los aminoácidos y catecolaminas se llevó a cabo aplicando el sistema de separación de cromatografía electrocinética micelar (MEKC por sus siglas en inglés). En el cual se adicionan monómeros anfífilicos denominados surfactantes al amortiguador de corrida (boratos 35mM, duodecil sulfato de sodio (SDS) 25mM, β -ciclodextrinas 5mM y 13- 17% de metanol grado HPLC para ampliar la ventana de migración), generando una separación por afinidad. Este método permite analizar volúmenes pequeños de muestra (en este caso 4 μ L de microdializado). Se cargaron 10 μ L de cada analito en viales cubiertos con aceite para evitar su evaporación. Se inyectaron las muestras aplicando 0.5 psi de presión durante 5s en cada vial para empujar el fluido a una porción del capilar (75 μ m de diámetro interno y 50cm de largo), aplicando 25kV de corriente

para la separación. La detección se realizó con fluorescencia inducida por láser (LIF, por sus siglas en inglés), con láser de ionización de argón con luz a 480nm (Beckman Coulter).

5.6.3 Integración (Cuantificación de analitos)

El resultado de la electroforesis capilar es una gama de curvas, denominada electroferograma, que deben ser identificadas para obtener posteriormente la concentración de cada neurotransmisor. Utilizamos como referencia una curva patrón de 6 puntos que nos indica la relación de la concentración de cada neurotransmisor (EI, GLUT, GABA, NE y DA) con el área bajo la curva del pico generado, se realizó una regresión lineal para conocer la concentración desconocida de nuestro interés que se integra al analizar el electroferograma obtenido en la EC. Tanto a las curvas patrón como a nuestras muestras se les añadió EI, que es un aminoácido que no se encuentra en la naturaleza, y sirve para corregir la variabilidad durante la reacción de derivatización e inyección de las muestras. El área bajo la curva de cada neurotransmisor fue interpolada en el programa Karat 2.1.

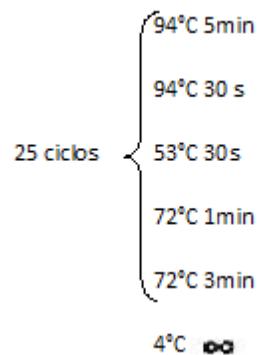
5.7 Genotipificación

Se comprobó la presencia o ausencia de transgenes en cada ratón por medio de una genotipificación aplicando la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés). El PCR es un método muy sensible de amplificación específica de ácidos nucleicos (McDonagh, 2003). La amplificación para la genotipificación de los ratones 3xTg-EA se realizó usando oligonucleótidos cebadores (APP, Tau, Thy 12.4, PS1-k13 y PS1-k15), que son complementarios a las regiones del ADN conocidas, en este caso los transgenes PS1_{M146V}, APP_{Swe} y tau_{P301} éstos últimos con el elemento regulador Thy 1.2.

La genotipificación consta de 3 partes: 1) Extracción de ADN, 2) Reacción en cadena de la *Taq* polimerasa y 3) Separación de los fragmentos amplificados mediante electroforesis.

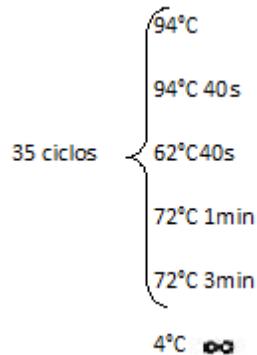
1) La extracción de ADN se realizó cortando un fragmento de la cola de aproximadamente 2mm de largo. Para la desnaturalización se colocaron y trituraron en viales tipo eppendorf de 1mL con 75µL de buffer de lisis alcalino (250µL de NaOH 10N; 40µL de EDTA 0.5M en 100mL de H₂O des ionizada) y se incubaron a 95°C durante 1 hora. Posteriormente se dejaron enfriar y se les adicionaron 75µL de buffer de neutralización (Tris-HCl 40mM en 100mL H₂O des ionizada), se mezcló y centrifugó a 12500 rpm durante 2 minutos a 4°C. Para finalizar este paso se tomaron 75µL del sobrenadante de cada muestra y se colocó en congelación (método del *hot shot*) (Rudbeck & Dissing, 1998).

2) La reacción en cadena de la *Taq* polimerasa para la amplificación de los fragmentos de ADN, se llevó a cabo colocando 2.5µL de “Coral Load” (buffer de PCR 1x, MgCl₂ y Glicerina), 0.5µL de dNTP's, 0.125µL de *Taq* Polimerasa, 21.875µL de H₂O, 1.5µL de una mezcla de los primers APP, Tau y el regulador Thy 12.4 más 3µL del ADN extraído; para la amplificación de los fragmentos de los gene APP y tau. Los ciclos de PCR para esta amplificación son:



Mientras que para la amplificación de los fragmentos de PS1, se agregaron 2.5µL de CL, 0.5 µL de dNTP's, 0.125 µL de *Taq* Polimerasa,

21.875µL de H₂O, 1.5µL de una mezcla de los primers PS1-k13 y PS1-k15 y 3µL del ADN extraído. Los ciclos en el termociclador son:



Posteriormente se realiza un corte en los fragmentos amplificados de PS1 por medio de la enzima Bst^{II} y el buffer NEB 1x más 20µL del resultado del PCR, incubándose durante 2 horas a 37°C, dando como resultado dos fragmentos que identificarán la presencia o ausencia de la mutación en PS1.

3) La separación de los fragmentos amplificados mediante electroforesis se realizó en geles de agarosa al 2% (37mL de TAE, 0.7g de agarosa y 5 µL de bromuro de etidio). La migración se efectuó en una cámara de Southern blot y una fuente poder a 75V durante 60 minutos. Se cargaron 10 µL de marcador de peso molecular y 20 µL de muestras. Después de la migración, se capturó la imagen del gel con bromuro de etidio en un transiluminador, filtro 2, Iluminación UV, 16 segundos de exposición (AlphaDigiDoc Rt, Alpha Innotech) (ver anexo imagen 1).

5.8 Histología

Pasado el día de la prueba del RO, los animales fueron sacrificados con sobredosis (0.1mL) de pentobarbital sódico (Holland, Méx.) y perfundidos transcárdialmente con solución salina 0.9% para retirar la sangre del cerebro y con una solución de paraformaldehído 4% en amortiguador de fosfatos (Fosfato de

sodio monobásico $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$, fosfato de sodio dibásico $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, pH 7.4) para fijar el tejido. Se extrajeron los cerebros, se colocaron en 10mL de paraformaldehído 4% y se almacenaron a 4°C. Posteriormente a la fijación del tejido se sometieron a tres gradientes de sacarosa (10%, 20% y 30%) a 4°C. Se obtuvieron cortes coronales de 40µm de grosor que fueron teñidos con la técnica de Nissl (violeta de cresilo) a la altura de las lesiones de las cánulas guía (CI e Hip), para comprobar que estuvieran en el sitio deseado (Ver anexo imagen 2).

5.9 Análisis estadístico

Todos los datos se presentan como la media \pm error estándar. Para el análisis estadístico se empleó una ANOVA de dos vías con la prueba post-hoc de Fisher o una t de Student de un grupo con la media hipotética de 0.5 para analizar diferencias conductuales en la exploración, un valor de $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo. El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el programa StatView versión 4.5.

5.9.1 Conducta

Los videos fueron analizados, y fue calculado el ÍRO de cada ratón por adquisición y prueba en Microsoft Excel 2007. Los índices fueron graficados mostrando los errores estándar y analizados con una prueba- t para un grupo, con 0.5 como media hipotética ($p < 0.05$ se consideró significativo) (Statview 4.57).

5.9.2 Análisis de neurotransmisores

Los resultados de la integración se corrigen relacionando el área bajo la curva de cada fracción con el área bajo la curva del estándar interno, el resultado se convirtió a porcentaje de línea basal (%LB) de liberación¹⁸. Los %LB se graficaron con error estándar y los datos fueron analizados con una prueba de ANOVA de dos vías para encontrar diferencias en la liberación de cada grupo con respecto al % de LB y respecto a la liberación de otro grupos en la misma fracción;

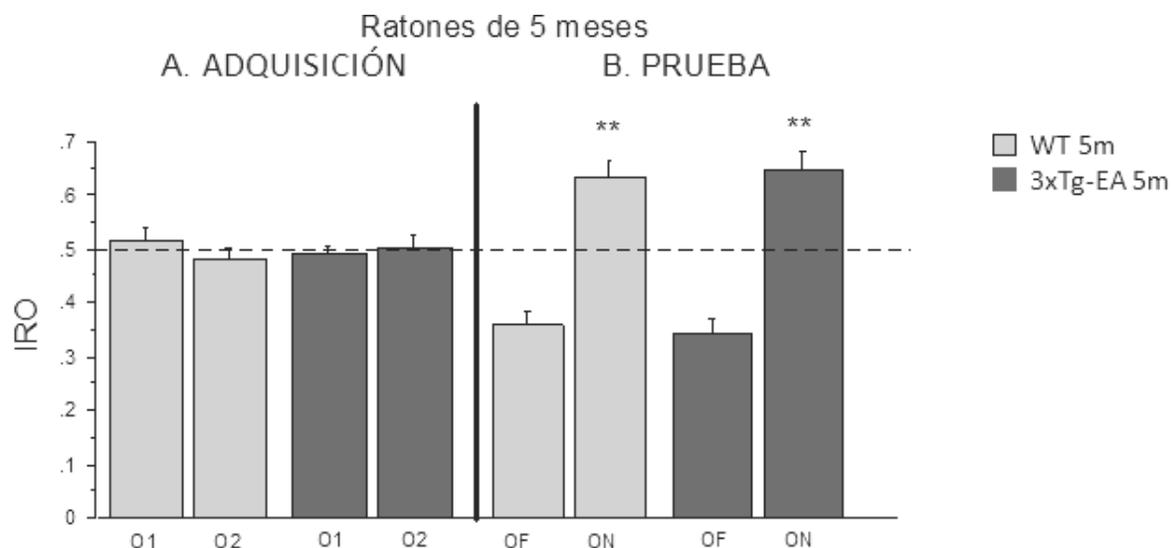
¹⁸ %LB= fracción *100 / \bar{X} de las tres primeras muestras, Microsoft Excel 2007.

para obtener diferencia dentro de los grupos por edad se empleó una prueba t pareada; $p < 0.05$ se consideró significativo (Statview 4.57).

VI. RESULTADOS

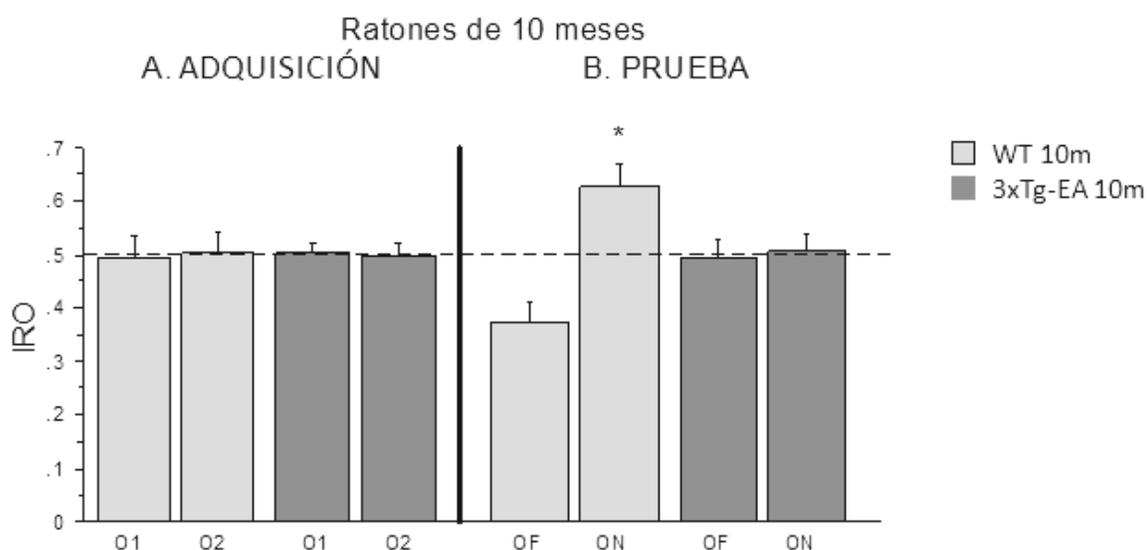
5.1 Déficit en la MLP de la MRO en ratones 3xTg- EA de 10 meses

Los ratones WT y los 3xTg-EA de 5 meses de edad mostraron un IRO alrededor de 0.5 durante la adquisición de la tarea, lo que equivale a que la exploración de los dos objetos fue equitativa, mientras que en la prueba, el IRO observado para el objeto novedoso muestra una diferencia significativa (WT $t_{(5)}=22.92$; 3xTg-EA $t_{(4)}=11.09$; $**p < 0.01$), lo que indica mayor tiempo de exploración del objeto novedoso en ambos grupos sin diferencia significativa entre ellos ($t_{(9)}=0.301$; NS)(Gráfica 1).



Gráfica 1. Exploración de los objetos durante la fase de adquisición y prueba a largo plazo de los ratones de 5 meses WT y 3xTG. A. Durante la fase de ADQ se muestra que tanto los ratones WT y 3xTg-EA exploran equitativamente el objeto uno (O1) y el objeto dos (O2) que en esta fase son exactamente iguales. En B. Se observa la fase de prueba de MLP 24 horas posteriores a la ADQ, los ratones de ambos grupos presentan una preferencia por el objeto novedoso (ON), y exploran menos el objeto familiar (OF). Datos expresados como índice de reconocimiento de objetos \pm Error Estándar (ES), $**p < 0.01$

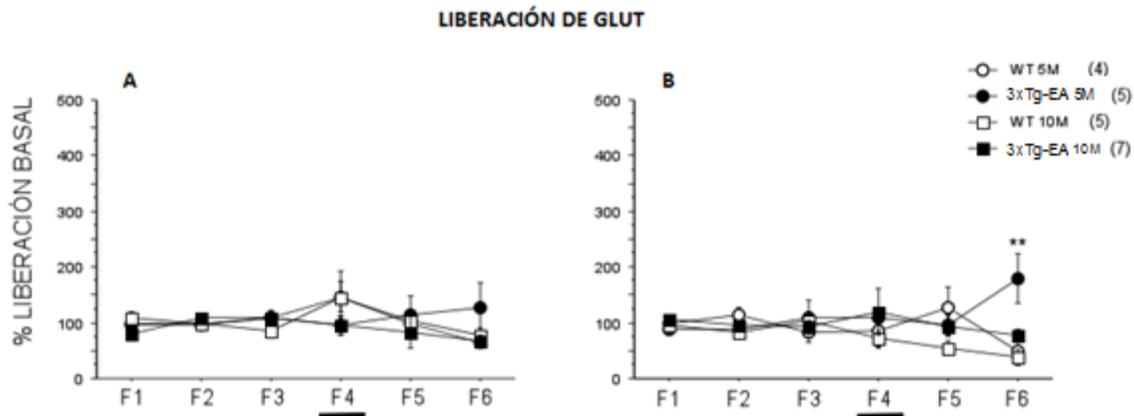
En la fase de adquisición, los ratones de 9 meses, tanto WT como 3xTg-EA, mostraron un IRO alrededor del 0.5 para ambos objetos. Durante la prueba, únicamente los ratones WT mostraron un IRO del objeto novedoso significativamente diferente con respecto a la media hipotética ($t_{(5)}= 3.03$; * $p < 0.05$), mientras que los ratones 3xTg- EA mostraron un IRO de 0.5 tanto para el objeto familiar como para el objeto novedoso ($t_{(6)}= 0.152$; NS), como ocurre en la adquisición. El análisis del IRO del objeto novedoso entre los grupos de 10 meses WT y 3xTg-EA muestra una diferencia significativa ($t_{(11)}= 2.36$; * $p < 0.05$). Se puede observar que los ratones transgénicos no exploraron mayor tiempo el objeto novedoso con respecto a los WT (Gráfica 2).



Gráfica 2. Exploración de los objetos durante la fase de adquisición y prueba a largo plazo de los ratones de 10 meses WT y 3xTG. A. Durante la fase de ADQ se muestra que tanto los ratones WT y 3xTg-EA exploran equitativamente el objeto uno (O1) y el objeto dos (O2) que en esta fase son exactamente iguales. En B. Se observa la fase de prueba de MLP 24 horas posteriores a la ADQ, únicamente los ratones WT presentan una preferencia por el objeto novedoso (ON), y exploran menos el objeto familiar, sin embargo los ratones 3xTg-EA no exploran más el objeto novedoso y, al igual que en la ADQ, exploran equitativamente ambos objetos (* $p < 0.05$). Datos expresados como índice de reconocimiento de objetos \pm ES, * $p < 0.05$

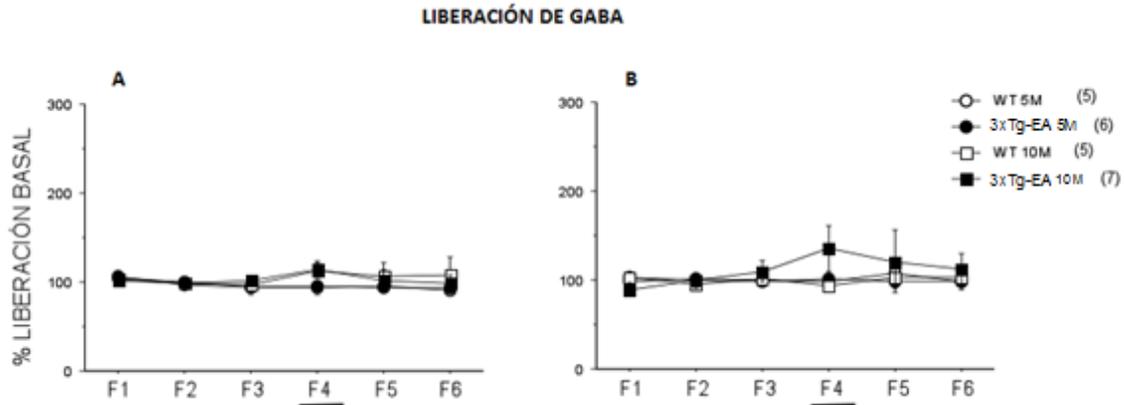
5.2 Concentraciones de GABA, GLUT y NE no muestran cambios significativos durante la ADQ de la MRO

Tanto en HIP como en CI, no se encuentran cambios significativos en los niveles de GLUT (niveles basales: 0.54 ± 0.14 pmol/ μ L para CI y 0.82 ± 0.21 pmol/ μ L para HIP) durante la adquisición de la memoria de reconocimiento (F4). Pueden observarse incrementos en hipocampo durante la F6 únicamente en el grupo de ratones 3xTg-EA de 5 meses, dicho incremento muestra $p < 0.01$ con respecto al grupo WT de 10 meses y una $p < 0.05$ con respecto a su porcentaje de liberación basal ($F_{(9, 352)} = 2.95$) (Gráfica 3).



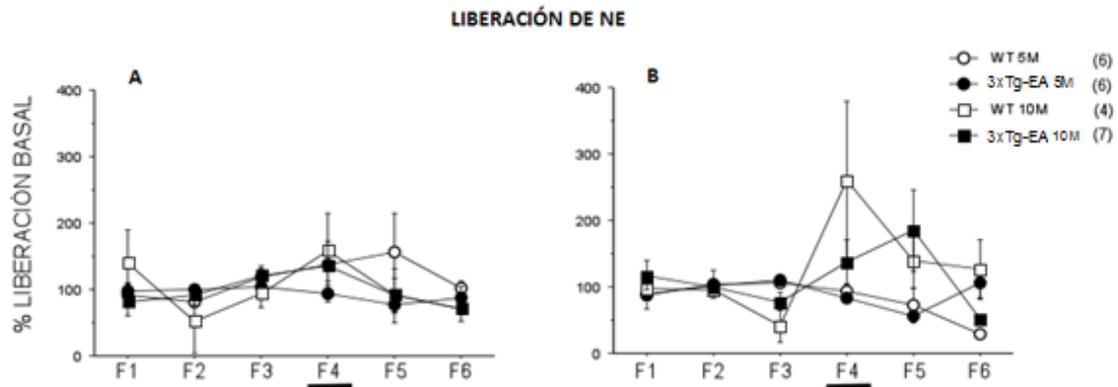
Gráfica 3. Liberación de glutamato durante la fase de adquisición de la tarea de MRO en A. corteza insular; B. hipocampo, no demuestran cambios significativos durante la exposición a los objetos por primera vez (F4) (barra — = exposición a los objetos por primera vez durante 10 minutos). Fracciones de 4 μ L las tres primeras constituyen la liberación basal. Datos expresados como % de liberación basal \pm ES. ** $p < 0.05$ comparado con la misma fracción de los demás grupos.

El neurotransmisor GABA (niveles basales: 0.19 ± 0.03 pmol/ μ L para CI y 0.23 ± 0.05 pmol/ μ L para HIP) no muestra cambios significativos con respecto al % de liberación basal durante fase de adquisición de la memoria de reconocimiento de objetos en ninguna de las dos estructuras monitoreadas (Gráfica 4).



Gráfica 4. Liberación de ácido gamma aminobutírico durante la fase de ADQ en la tarea de MRO en A. corteza insular, sin cambios significativos; B. hipocampo, tampoco muestra cambios significativos. ADQ (F4) de MRO (barra — = exposición a los objetos por primera vez durante 10 minutos). Fracciones de 4 μ L las tres primeras constituyen la liberación basal. Datos expresados como % de liberación basal \pm ES.

La liberación de norepinefrina durante la ADQ del RO, muestra amplias fluctuaciones durante las fracciones 4, 5 y 6 en hipocampo, sin embargo no existen diferencias significativas de estas fluctuaciones en cada fracción con respecto a los porcentajes de LB que presenta cada grupo (0.2 ± 0.05 fmol/ μ L para CI y 0.32 ± 0.09 para HIP).



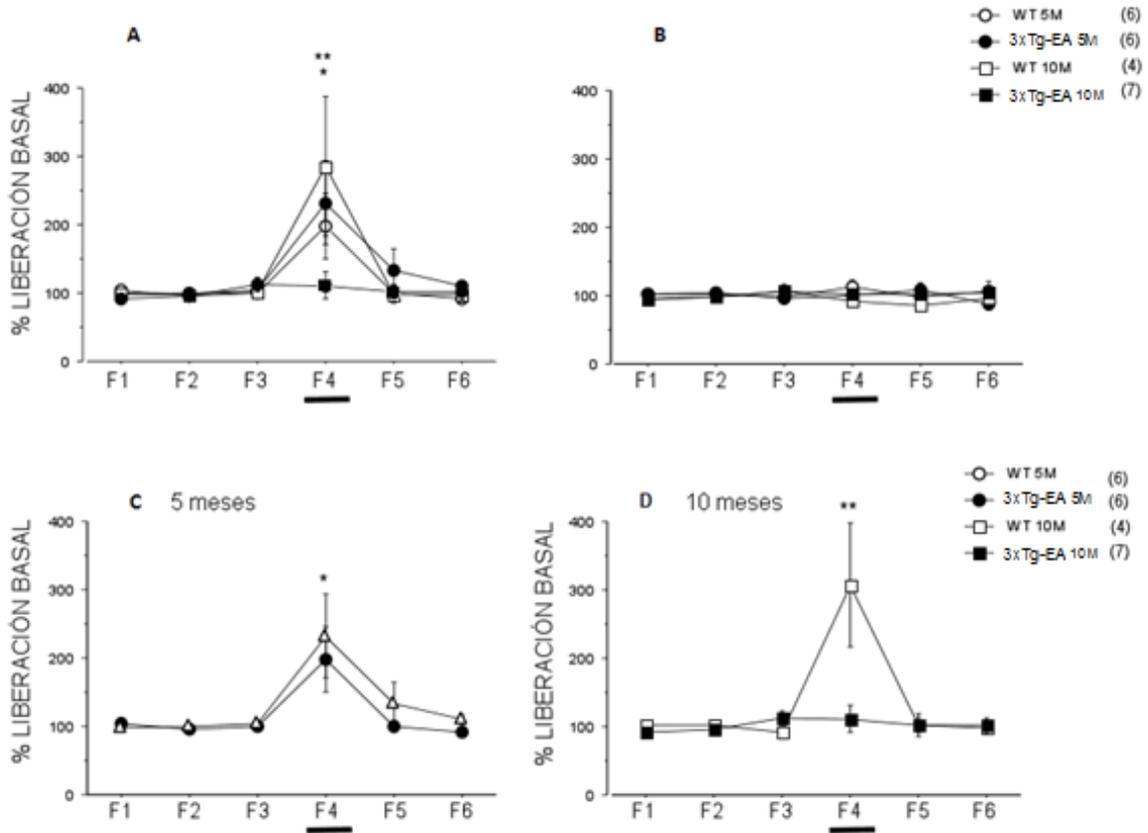
Gráfica 5. Liberación de norepinefrina durante la fase de ADQ de la tarea de MRO en A. corteza insular; B. hipocampo. ADQ (F4) (barra — = exposición a los objetos por primera vez durante 10 minutos). Fracciones de 4 μ L las tres primeras constituyen la liberación basal. Datos expresados como % de liberación basal \pm ES.

5.3 Ratones 3xTg- EA de 9 meses no muestran incremento en los niveles de dopamina extracelular ante estímulo nuevo en la MRO

En la gráfica 6 se muestra la liberación de dopamina, en corteza insular (A) se muestra un aumento significativo con respecto a la liberación basal, (B) se muestra la liberación de DA en hipocampo que no tiene cambios significativamente mayores con respecto al porcentaje de línea basal (niveles basales: 0.15 ± 0.09 fmol/ μ L para CI y 0.32 ± 0.13 fmol/ μ L para HIP) durante la fase de adquisición de la MRO en ratones silvestres de 5 y 10 meses y transgénicos de 5 meses (WT5m: $F_{(9,80)} = 10.706$, $p < 0.01$; Tg5m: $F_{(9,80)} = 4.244$, $p < 0.05$; WT10m: $F_{(9,48)} = 4.996$, $p < 0.01$ con respecto a su línea basal de liberación) (Gráfica 6).

Por otra parte, el grupo transgénico de 10 meses de edad no muestra dicho incremento ya que mantiene su liberación de DA en niveles basales, presentando diferencias contra el resto de los grupos en la F4 (ANOVA post hoc, $F = 3.615$, WT5m: $p < 0.05$; 3xTg5m: $p < 0.05$; WT10m: $p < 0.01$), lo que indica su déficit en el incremento de los niveles de DA en CI durante la presentación de estímulos nuevos.

LIBERACIÓN DE DA



Gráfica 6. Liberación de dopamina en A. corteza insular; B. hipocampo; C y D. únicamente se muestra la liberación de corteza insular separada por edades, (C) 5 meses, tanto WT como 3xTg-EA muestran un aumento durante la fase de ADQ de la MRO (F4), (D) 10 meses, los ratones 3xTg-EA no muestran el aumento en los niveles de DA durante la F4 (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$) (barra — = exposición a los objetos por primera vez durante 10 minutos). Datos expresados como % de liberación basal \pm ES.

VII. DISCUSIÓN

Las investigaciones en los modelos transgénicos que desarrollan una patología similar a la que se presenta a los enfermos con Alzheimer, ha permitido entender procesos moleculares en conjunto con procesos de adquisición y almacenamiento de información para la formación de memorias. El desarrollo de técnicas de monitoreo *in vivo* como la microdiálisis en conjunto con técnicas de detección y análisis como la electroforesis capilar, nos permiten conocer los cambios extracelulares de ciertos neurotransmisores en determinadas estructuras que participan en el procesamiento de estímulos nuevos. El presente trabajo es el primero en su tipo y describe la liberación de neurotransmisores durante la adquisición de la tarea conductual de reconocimiento de objetos. De esa manera pudimos correlacionar los déficits de memoria con los cambios extracelulares de neurotransmisores para comprender mejor los procesos que subyacen en el aprendizaje tanto en condiciones normales como en presencia de alguna patología.

6.1 Déficit en la memoria de reconocimiento

El estudio de los déficits cognitivos en pacientes con Alzheimer, ha revelado que uno de los tipos de memoria que se ven afectados es la memoria episódica, particularmente la de reconocimiento. Un ejemplo claro se observa con la memoria visual a corto plazo, la cual se afecta desde etapas tempranas de la enfermedad (Parra *et al.*, 2010), así como con la memoria de reconocimiento de palabras (Cuetos *et al.*, 2010; Reeves *et al.*, 2010). Nuestros resultados indican que en el modelo murino 3xTg-EA de 10 meses de edad, existe deterioro en la memoria de reconocimiento de objetos debido al déficit presentado en el paradigma conductual de RO, lo que se compara con este mismo déficit encontrado en ratones transgénicos para PPA, que durante la MLP no exploran más el objeto nuevo con respecto al familiar (Escribano *et al.*, 2010, Greco *et al.*, 2010). Esta falta de reconocimiento de objetos se observa únicamente en ratones de 10 meses, lo que

indica que los jóvenes (de 5 meses) aún pueden adquirir y procesar la información, mientras que los de 10 meses presentan daño durante el procesamiento de los estímulos, en este caso, de los objetos. Los antecedentes de acumulación de βA a partir de los 6 meses de edad en la corteza frontal e hipocampo (Fig 18), se relacionan con un deterioro en la potenciación a largo plazo (PLP) y una disfunción en la transmisión sináptica en este modelo a partir de esa edad (Oddo *et al.*, 2003b). Aunado a las hipótesis que indican el péptido βA contribuye con la disfunción sináptica, desregulación de la homeostasis de Ca^{2+} y con la hiperfosforilación de *tau* (LaFerla & Oddo, 2005), nos indican que este déficit cognitivo únicamente se hace visible en ratones 3xTg-EA de 10 meses de edad, con acumulación de βA en corteza e hipocampo y de tau hiperfosforilada, lo que conlleva a la disfunción sináptica y probablemente al déficit cognitivo (Oddo *et al.*, 2003a)

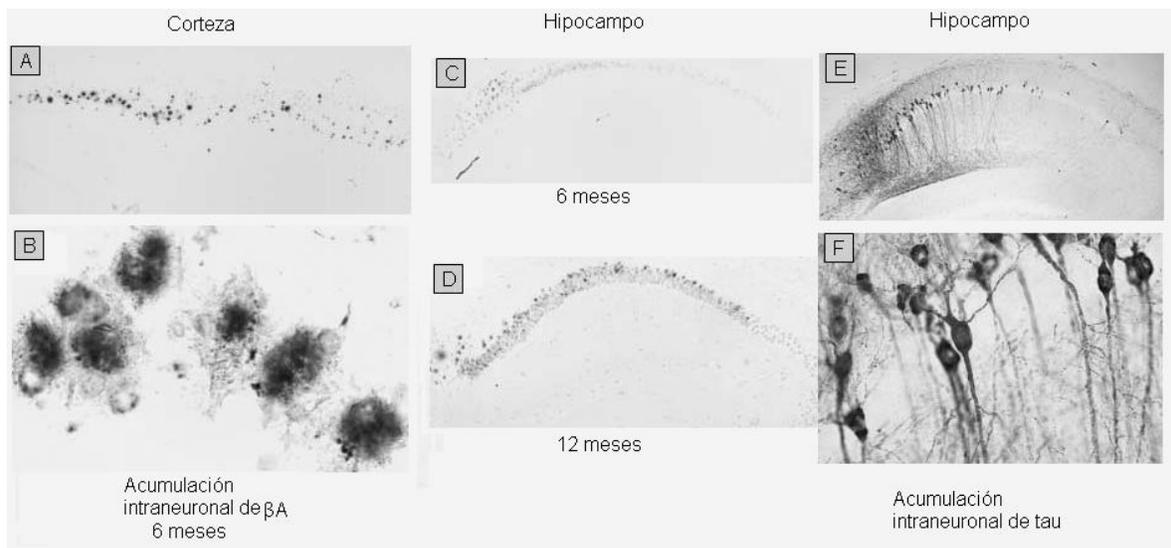


Fig. 18. Acumulación del péptido βA y la proteína tau. A. Inmunoreactividad en neocorteza, B. Acercamiento en donde se puede observar la acumulación del péptido; C. Inmunoreactividad de βA en hipocampo, avanza progresivamente desde los 6 meses (imagen superior), D. hasta los 12 meses (imagen inferior); E. Inmunoreactividad en hipocampo para la proteína tau fosforilada, F. con el aumento que muestra las neuronas con acumulación (Modificado de Oddo *et al.*, 2003b).

6.2 Déficit en la liberación de DA en ratones 3xTg- EA.

A pesar de los antecedentes en ratas sobre la importancia de los receptores glutamatérgicos NMDA y AMPA en hipocampo y cortezas parahipocampales durante la memoria de reconocimiento (Dere *et al.*, 2007), se conoce poco sobre la participación del GLUT *per se* durante la tarea de RO, particularmente durante su adquisición. Existen evidencias en ratas expuestas a un estímulo novedoso que no muestran liberación de GLUT ni de GABA en corteza prefrontal (Giovannini *et al.*, 2001). Dichos antecedentes apoyan los resultados encontrados en el presente trabajo, los neurotransmisores GLUT y GABA no muestran aumento significativo con respecto a los porcentajes de línea basal durante la ADQ de la MRO, lo que indica que no participan en la señalización para el procesamiento de dicha tarea, particularmente durante la fase monitoreada, es decir, la adquisición.

Por otra parte un neurotransmisor controversial al momento de presentar estímulos novedosos es la NE, de la cual existe liberación ante la exposición a ambientes novedosos, y se ha descrito que la liberación de NE se relaciona con estímulos que ocasionan cierto estrés en ratas, particularmente en corteza prefrontal (Pudovkina *et al.*, 2001; McQuade *et al.* 1999).

A pesar de existir evidencia de la participación de receptores noradrenérgicos en la amígdala basolateral para la consolidación de la memoria de reconocimiento de objetos (Roosendaal *et al.*, 2008) no existen antecedentes sobre la participación de la NE en la tarea de RO en corteza. En el monitoreo presentado existe una gran variabilidad en la liberación entre los grupos y dentro de los grupos, a pesar de no encontrarse diferencias significativas, nos podría indicar cierto nivel de estrés en los animales durante el desarrollo de los experimentos. Pese a ello es importante mencionar que el aumento en los niveles de NE pueden estar relacionados con el aumento de la concentración en los niveles extracelulares de DA, ya que se sabe la relación sinérgica que existe entre ambos neurotransmisores. Los niveles de DA pueden inducir un incremento en la

concentración de NE en corteza prefrontal (Pan *et al.*, 2004), y desde el punto de vista conductual la NE no muestra diferencias significativas en ningún grupo durante la ADQ de la MRO, por lo que esta variabilidad en sus niveles extracelulares no podríamos adjudicarla directamente al estímulo novedoso que son los objetos.

La DA es un neurotransmisor importante durante la presentación de estímulos nuevos, particularmente sabores (Guzmán *et al.* en preparación; Kim *et al.*, 2010) y juega un papel importante para la consolidación de la tarea de RO (Hotte *et al.*, 2005; Nagai *et al.*, 2007; Maroun & Akirav, 2009). En el presente trabajo pudimos observar un aumento en la liberación de DA en ratones WT de 10 y 5 meses así como 3xTg-EA de 5 meses durante la ADQ de la MRO, únicamente en CI, aunado a un buen desempeño conductual, lo que indica que la DA está participando durante esta fase de la tarea. Dicha participación la pudimos corroborar al obtener un déficit en la liberación de DA en ratones 3xTg-EA de 10 meses los cuales no reconocen el objeto nuevo con respecto al familiar, es decir, no desempeñan óptimamente la tarea de RO.

La participación de la dopamina en la memoria de reconocimiento ha sido descrita por medio de agonistas de receptores D1 mejorando conductualmente el paradigma de RO (Martins de Lima *et al.*, 2010) y en conjunto con las evidencias de antagonistas para ese mismo tipo de receptores que deterioran la MLP del paradigma conductual (Nagai *et al.*, 2007), lo que nos ayuda a confirmar la participación de la DA en dicha tarea. Así mismo se ha observado que la DA participa en tareas de reconocimiento en individuos sanos con desempeño conductual óptimo en tareas motoras, de memoria episódica verbal y espaciales, mientras en pacientes con la EA se ve deterioro de dichas tareas y menor actividad dopaminérgica, lo que indica el posible beneficio que tendrían terapias con agonistas de los receptores D2 en individuos con dichos padecimientos (Reeves *et al.*, 2010).

Resultados preliminares obtenidos sobre la administración de nomifensina¹⁹ previo a la ADQ de la tarea de RO rescatando la MLP y aumentando los niveles de DA extracelular en ratones 3xTg-EA (Guzmán *et al.* en preparación) aunado a evidencias que muestran que la administración de donepezil, fármaco utilizado en pacientes con la EA, que aumenta las concentraciones extracelulares de acetilcolina, a su vez puede aumentar las concentraciones extracelulares de dopamina en CPF (Nivsarkar & Banerjee, 2006) e hipocampo dorsal (Shearman *et al.*, 2006).

Los antecedentes nos indican que la DA es un neurotransmisor que se ve afectado en su liberación, lo que se relaciona con el deterioro en el desempeño de tareas conductuales, esta relación ha llevado a desarrollar hipótesis sobre el déficit en el sistema dopaminérgico. La DA es un neurotransmisor que en condiciones normales puede generar productos oxidativos durante su deaminación, como el DOPAL (ácido 3, 4-dihidroxifenilacético) mismo que está implicado en el daño celular y mitocondrial (Jinsmaa *et al.*, 2011), este daño mitocondrial aumenta la acumulación del péptido β A (Querfurth & LaFerla, 2010), y por ende el daño celular, posiblemente, de neuronas dopaminérgicas.

Pese a ello, resultados preliminares que obtuvimos indican que la administración de alto potasio (HK^+) en corteza insular ocasiona un incremento de GLUT y GABA, así como de DA de hasta 200% con respecto al porcentaje de línea basal en ratones 3xTg-EA, lo que indica que aún hay cantidad suficiente ya que se pudo rescatar tanto la liberación de DA como la conducta con nomifensina por retrodiálisis.

Debido a que se comienza a sugerir un papel relevante de la DA en la EA y es conocida su participación central en las tareas de reconocimiento, es posible que se consigan efectos favorables a través de tratamientos que induzcan liberación

¹⁹ Fármaco que inhibe la recaptura de DA y permite que permanezca mayor tiempo en el espacio extracelular.

dopaminérgica; por ejemplo la estimulación de diversos modelos roedores con un ambiente enriquecido²⁰ aumenta los niveles de DA en núcleo accumbens, así como de DA y acetilcolina en CPF (Segovia *et al.*, 2010; Mora *et al.*, 2007). Existe evidencia de que un ambiente enriquecido tiene efectos óptimos en un modelo murino para la EA en actividades espaciales como el laberinto acuático de Morris, mejorando su desempeño, mientras que molecularmente contribuye reduciendo los niveles de los péptidos β A en Hip y CPF (Jankowsky *et al.*, 2005; Teather *et al.*, 2002). Estos datos se complementan con el efecto positivo que tiene la levodopa sobre la conducta animal (Ambrée *et al.*, 2008), sin embargo no tiene efectos de protección neuronal, por lo que su mecanismo aún es una incógnita (Nivsarkar & Banerjee, 2009). Con estas inferencias y resaltando evidencias de una sinergia entre la acetilcolina y la dopamina en zonas del cuerpo estriado y en áreas límbicas, siendo la acetilcolina un promotor de la activación de terminales dopaminérgicas aumentando la liberación de DA (Zhang *et al.*, 2002), se ha observado una asociación acetilcolina-DA para el desempeño del laberinto acuático de Morris (Wisman *et al.*, 2008). Los antecedentes, resultados preliminares y nuestros resultados en conjunto, nos ayudan a sugerir un tratamiento que incluya a ambos sistemas, tanto el colinérgico como al dopaminérgico para beneficiar más ampliamente la condición de los neurotransmisores y la condición nemónica en los pacientes con la enfermedad de Alzheimer.

²⁰ Estimulación conductual que se hace en ambientes con objetos, texturas, colores y diferentes estructuras que les permitan a los modelos animales explorar continuamente y de manera diferente cada que se exponen a dicho ambiente.

VIII. CONCLUSIONES

El modelo murino 3xTg para la enfermedad de Alzheimer presenta un déficit en la memoria de reconocimiento a la edad de diez meses, acompañado de un déficit de liberación de DA durante la adquisición del paradigma conductual de reconocimiento de objetos. Los resultados presentados en este trabajo también muestran que los neurotransmisores GABA, GLUT y NE no participan durante la ADQ de la MRO en ratones. Cabe mencionar que experimentos de esta índole, aplicados a modelos murinos que presentan las características patológicas de la EA ayudarán a comprender mejor las características de la patología y, en conjunto con experimentos venideros, a desarrollar nuevos tratamientos aplicables a pacientes con la EA.

IX. LITERATURA CITADA

Ambrée, O., Richter, H., Sachser, N., Lewejohann, L., Dere, E., de Souza, V., Herring, A., Keyvani, K., Paulus, W., Schäbitz, W. 2007. Levodopa ameliorates learning and memory deficits in a murine model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging*, Vol. 30: 1192- 1204.

Anderson, J. 1995. *Learning and memory, an integrated approach*, John Wiley & Sons Ed, USA; p.p. 7- 8.

Bacskai, B., Hochner, B., Mahaut-Smith, M., Kaang, B., Kandel, E., Tsien, R. Spatially resolved dynamics of cAMP and protein kinase A subunits in *Aplysia* sensory neurons. *Science* 9, 260 (5105): 222-226.

Balderas, I., Rodriguez, C., Salgado, P., Chavez, J., McGaugh, J., Bermúdez, F. 2008. The consolidation of object and context recognition memory involve different regions of the temporal lobe. *Learning & Memory* 15: 618- 624.

Ballesteros, S. 1999. Memoria humana: investigación y teoría. *Psicothema*, 11 (4): 705-723.

Barclay, A., Hydén, H. 1978. Localization of the Thy-1 antigen by immunofluorescence on neurons isolated from rat brain. *Journal of neurochemistry* 32: 1583- 1586.

Barker, G., Bashir, Z., Brown, M., Warburton, E. 2006. A temporally distinct role for group I and group II metabotropic glutamate receptors in object recognition memory. *Learning and memory*, 13: 178- 186.

Bassareo, V., Di Chiara, G. 1997. Differential influence of associative and nonassociative learning mechanisms on the responsiveness of prefrontal and accumbal dopamine transmission to food stimuli in rats fed ad libitum. *The journal of neuroscience* 17 (2): 851- 861.

Berman, D., Hazvi, S., Neduva, V., Dudai, Y. 2000. The role of identified neurotransmitter systems in the response of insular cortex to unfamiliar taste: activation of ERK 1-2 and formation of a memory trace. *The journal of neuroscience*, 20 (18): 7017- 7023.

Bermúdez- Rattoni, F., Okuda, S., Roozendaal, B., McGaugh, J. 2005. Insular cortex is involved in consolidation of object recognition memory. *Learning and memory*, 12: 447- 449.

Breedlove, S., Rosenzweig, M., Watson, N. 2007. *Biological Psychology, an introduction to behavioral, cognitive and clinical neuroscience*, 5th ed., Sinauer associates, USA; p.p. 513- 515.

Brown, M., & Aggleton, J. (2001). Recognition memory: what are the roles of the perirhinal cortex and hippocampus? *Nature Reviews Neuroscience*. 2 (1): 51- 61.

Buée, L., Bussière, T., Buée-Scherrer, V., Delacourte, A., Hof, P. 2000. Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders, *Brain Research Reviews* 33: 95- 130.

Buti, C., Hof, P. 2010. The insular cortex: a comparative perspective, *Brain structure function*, 214: 477- 493.

Carrillo-Mora, P. 2010a. Sistemas de memoria: reseña histórica, clasificación y conceptos actuales. Primera parte: historia, taxonomía de la memoria, sistemas de memoria de largo plazo: la memoria semántica, *Salud mental*, 33: 85- 93.

Carrillo-Mora, P. 2010b. Sistemas de memoria: reseña histórica, clasificación y conceptos actuales. Segunda parte: Sistemas de memoria de largo plazo: Memoria episódica, sistemas de memoria no declarativa y memoria de trabajo, *Salud mental*, 33: 197- 205.

Chin, J., Roberson, E., Mucke, L. 2008. Molecular Aspects of memory dysfunction in Alzheimer's disease. Elsevier, p.p.706-739.

Clark, R., Hutton, M., Fuldner, S., Froelich, E., Karran, C., Talbot, R., Crook, C., Lendon, G., Prihar, C., Korenblat, K., Martínez, A., Wragg, M., Busfield, F., Behrens, M., Myers, A., Norton, J., Morris, J., Mehta, N., Pearson, C., Lincoln, S., Baker, M., Duff, K., Zehr, C., Pérez-Thur, J., Houlden, H., Ruiz, A., Ossa, J., Lopera, F., Arcos, M., Madrigal, L., Collinge, J., Humphreys, C., Ashworth, A., Sarnier, S., Fox, N., Harvey, R., Kennedy, A., Roques, P., Cline, R., Philips, C., Venter, J., Forsell, L., Axelman, K., Lilius, L., Johnston, J., Cowburn, R., Viitanen, M., Winblad, B., Kosik, K., Haltia, M., Poyhonen, M., Dickson, D., Mann, D., Neary, D., Snowden, J., Lantos, P., Lannfelt, L., Rossor, M., Roberts, G., Adams, M., Hardy, J., Goate, A. 1995. The structure of the presenilin 1 (S182) gene and identification of six novel mutations in early onset AD families. *Nature genetics*, 11: 219- 222.

Cuetos, F., Herrera, E., Ellis, A. 2010. Impaired Word recognition in Alzheimer's disease: the role of age of acquisition. *Neuropsychologia*, 48: 3329- 3334.

Czech, C., Tremp, G., Pradier, L. 2000. Presenilins and Alzheimer's disease: biological functions and pathogenic mechanisms. *Progress in Neurobiology* 60: 363-384.

Dehmelt, L., Halpain, S. 2004. The MAP2/Tau family of microtubule-associated proteins. *Genome biology*, 6:204.

Dere, E., Huston, J., De Souza Silva, M. 2007. The pharmacology, neuroanatomy and neurogenetics of one-trial object recognition in rodents, *Neuroscience and biobehavioral reviews*. 31: 673- 704.

De Paula, V., Guimarães, F., Diniz, B., Forlenza, O. 2009. Neurobiological pathways to Alzheimer's disease. Amyloid-beta, TAU protein or both? *Dementia & Neuropsychologia*, 3: 188-194.

Diamandis, M., Diamandis, E., McLaurin, J., Holtzman, D., Schmitt-Ulms, G., Quirion, R. 2011. Alzheimer Disease: Advances in pathogenesis, diagnosis and therapy. *Clinical chemistry* 57:5, 1-6.

Dougherty, J., Wu, J., Nichols, R. 2003. B-Amyloid regulation of presynaptic nicotinic receptors in rat hippocampus and neocortex. *The journal of neuroscience*, 23 (17): 6740- 6747.

Dudai, Y. 1989. The neurobiology of memory. Concepts findings, trends, Oxford University press, USA; p.p. 38-39.

Dudai, Y. 2004. The neurobiology of consolidations, or how stable is the engram? *Annual reviews of psychology*, 55: 51- 86.

Dulawa, S., Grandy, D., Low, M., Paulus, M., Geyer, M. 1999. Dopamine D4 receptor-Knock-out mice exhibit reduced exploration of novel stimuli. *The journal of neuroscience* 19 (21): 9550- 9556.

Eichenbaum, H. 2003. Neurociencia cognitiva de la memoria: una introducción, Ariel neurociencia 1^{ed}, Barcelona.

Ennaceur, A., Delacour, J. 1988. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behavioural Brain Research*, 31, 47- 59.

Ennaceur, A. 2010. One-trial object recognition in rats and mice: Methodological and theoretical issues. *Behavioural Brain Research*, 215:2, 244- 254.

Escribano, L., Simón, A., Gimeno, E., Cuadrado, M., López, R., García, A., Ricobaraza, A., Pérez, A., Del Río, J., Frechilla, D. 2010. Rosiglitazone rescues memory impairment in Alzheimer's transgenic mice: mechanisms involving a reduced amyloid and tau pathology. *Neuropsychopharmacology*, 35: 1593- 1604.

Gall, J. 1835. On the functions of the brain and of each of its parts: with observations on the possibility of determining the instincts, propensities and talents, or the moral and intellectual dispositions of men and animals, by the configuration of the brain and head. Marsh, Capen & Lyon, Boston, USA.

Gamblin, C., Berry, R., Binder, L. 2003. Modeling Tau polymerization in vitro: A review and synthesis, *Biochemistry*, 42 (51): 15009- 15017.

Giovannini, M., Rakovska, A., Benton, R., Pazzagli, M., Bianchi, L., Pepeu, G. 2001. Effects of novelty and habituation on acetylcholine, GABA and glutamate release from the frontal cortex and hippocampus of freely moving rats. *Neuroscience* 106 (1): 43- 53.

Goedert, M. 2004. Tau protein and neurodegeneration. *Seminars in cell & developmental biology*, 15: 45- 49.

Goedert, M., Jakes, R. 2004. Mutations causing neurodegenerative tauopathies. *Biochimica et Biophysica Acta* 1739: 240-250.

Gondra, J. M. 1997. Historia de la psicología: introducción al pensamiento psicológico moderno. Vol. I. Nacimiento de la psicología científica, Editorial Síntesis, España; p.p. 25.

Goodwin, J. 2008. A history of modern psychology, 3rd ed., John Wiley & sons, USA; p.p. 90-92.

Greco, S, Bryan, K., Sarkar, S., Zhu, X., Smith, M., Ashford, W., Johnston, J., Tezapsidis, N., Casadesus, G. 2010. Leptin reduces pathology and improves memory in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease, *Journal of Alzheimers disease*, 19 (4): 1155- 1167.

Grönholm, P., Rinne, J., Laine, M. 2010. Learning and forgetting new names and objects in MCI and AD, *Neuropsychologia*, 48: 1079- 1088.

Gulinello, M., Gertner, M., Mendoza, G., Schoenfeld, B., Oddo, S., LaFerla, F., Choi, C., McBride, S., Faber, D. Validation of a 2-day water maze protocol in mice, *Behavioural Brain Research* 196: 220- 227.

Guzmán-Ramos Kioko, Moreno-Castilla Perla, Bermudez-Rattoni Federico, Dopamine disfunction during CTA training is involved in 3xTg-AD cognitive disfunction, en preparacion.

Harlow, H., McGaugh, J., Thompson, R. 1971. *Psychology*, Albion publishing company, San Francisco; p.p. 278-280.

Hawkins, R., Kandel, E., Bailey, C. 2006. Molecular mechanisms of memory storage in *Aplysia*, *Biological Bulletin*, 210, 174- 191.

- Hebb**, D. 1949. The organization of behavior, Ed. Wiley, New York.
- Hedskog**, L., Hansson, C., Svensson, A., Welander, H., Tjernberg, L., Karlström, H., Ankarcrona, M. 2010. Gamma- secretase complexes containing caspase-cleaved presenilin-1 increase intracellular A 42/ A 40 ratio, postprint in Journal of cellular and molecular medicine, DOI: 10.1111/j.1582-4934.2010.01208.x
- Hellstrom-Lindahl**, E., Viitanen, M., Marutle, A. 2009. Comparison of A levels in the brain of Swedish APP 679, 671 y PS1m146 mutation carriers and patients with sporadic Alzheimer's disease. *Neurochemistry international*, 55 (4): 243- 252.
- Himeno**, E., Ohyagi, Y., Ma, L., Nakamura, N., Miyoshi, K., Sakae, N., Motomura, K., Soejima, N., Yamasaki, R., Hashimoto, T., Tabira, T., LaFerla, F., Kira, J. 2011. Apomorphine treatment in Alzheimer mice promoting amyloid- β degradation. *Annals of neurology*, 69: 248- 256.
- Ho**, L., Xiang, Z., Mukherjee. P., Zhang, W., De Jesús, N., Mirjany, M., Yemul, S., Pasinetti, G. 2001. Gene expression profiling of the tau mutant (P301L) transgenic mouse brain. *Neuroscience Letters*, 310: 1- 4.
- Hong**, M., Zhukareva, V., Vogelsberg-Ragaglia, V., Wszolek, Z., Reed, L., Miller, B., Geschwind, D., Bird, T., McKeel, D., Goate, A., Morris, J., Wilhelmsen, K., Schellenberg, G., Trojanowski, J., Lee, V. 1998. Mutation-specific functional impairments in distinct tau isoforms of hereditary FTDP- 17. *Science*, 282: 1914- 1917.
- Hotte**, M., Naudon, L., Jay, T. 2005. Modulation of recognition and temporal order memory retrieval by dopamine D1 receptor in rats. *Neurobiology of learning and memory*, 84: 85- 92.
- Huong**, V. Shimanouchi, T., Shimauchi, N., Yagi, H, Umakoshi, H., Goto, Y., Kuboi, R. 2010. Catechol derivatives inhibit the fibril formation of amyloid- β peptides. *Journal of bioscience and bioengineering*, 109 (6): 629- 634.
- Hutton**, M., Lendon, C., Rizzu, P., Baker, M., Froelich, S., Houlden, H., Pickering-Brown, S., Chakraverty, S., Isaacs, A., Grover, A., Hackett, J., Adamson, J., Lincoln, S., Dickson, D., Davies, P., Petersen, R., Stevens, M., Graaf, E., Wauters, E., van Baren, J., Hillebrand, M., Joosse, M., Kwon, J., Nowotny, P., Kuei Che, L., Norton, J., Morris, J., Ree, L., Trojanowsky, J., Basun, H., Lannfelt, L., Dodd, P., Haywards, N., Kwok, J., Schofield, P., Andreadis, A., Snowden, J., Hardy, J., Goate, A., van Swieten, J., Mann, D., Lynch, T., Heutink, P. 1998. Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP- 17. *Nature* 393:702-705.
- Jankowsky**, J., Melnikova, T., Fadale, D., Xu., G., Slunt, H., Gonzales, V., Younkin, L., Younkin, S., Borchelt, D., Savonenko, A. 2005. Environmental enrichment mitigates cognitive deficits in a mouse model of alzheimer's disease. *The journal of neuroscience*, 25(21): 5217- 5224.
- Jinsmaa**, Y., Florang, V., Rees, J., Mexas, L., Eckert, L. Allen, E., Anderson, D., Doorn, J. 2011. Dopamine-derived biological reactive intermediates and protein modifications: implications for Parkinson's disease. *Chemico-biological interactions*, Artículo en corecciones..
- Johnson**, G. & Stoothoff, W. 2004. Tau phosphorylation in neuronal cell function and dysfunction. *Journal of cell science*,. 117: 5721- 5729.
- Johnson**, S., Schmitz, T., Moritz, C., Meyerand, M., Rowley, H., Alexander, A., Hansen, K., Gleason, C., Carlsson, C., Ries, M., Asthana, S., Chen, K., Reiman, E., Alexander, G. 2006. Activation of brain regions vulnerable to Alzheimer's disease: the effect of mild cognitive impairment. *Neurobiology of aging*, 27: 1604- 1612.

- Kalat**, J. 2007. Biological psychology, Thomson Learning, USA; p.p. 387, 389
- Kandel**, E., Schwartz, J., Jessell, T. 2000. Principles of neural science, Mc Graw- Hill, New York.
- Kim**, YB., Matthews, M., Moghaddam, B. 2010. Putative γ -aminobutyric acid neurons in the ventral tegmental area have a similar pattern of plasticity as dopamine neurons during appetitive and aversive learning. *European journal of neuroscience*, 32: 1564- 1572.
- Kumar**, U., Patel, S. 2007. Immunohistochemical localization of dopamine receptor subtypes (D1R-D5R) in Alzheimer's disease brain. *Brain research*, 1131: 187-196.
- LaFerla**, F., Tinkle, B., Bieberich, C., Haudenschild, C. & Jay, G. 1995. The Alzheimer's A β peptide induces neurodegeneration and apoptotic cell death in transgenic mice. *Nature Genetics*, 9, 21- 30.
- LaFerla**, F., Oddo, S. 2005. Alzheimer's disease: A β , tau and synaptic dysfunction, *Trends in molecular medicine* 11(4), 170- 176.
- LaFerla**, F., Green, K., Oddo, S. 2007. Intracellular amyloid- β in Alzheimer's disease. *Nature* 8: 499- 509.
- LaFerla**, F. 2010. Pathways linking A β and tau pathologies. *Biochem. Soc. Trans.*, 38: 993-995.
- Lanni**, C., Nardinocchi, L., Puca, R., Stanga, S., Uberti, D., Memo, M., Govoni, S., D'Orazi, G., Racchi, M. 2010. Homeodomain interacting protein kinase 2: A target for Alzheimer's beta amyloid leading to misfolded p53 and inappropriate cell survival. *PLoS ONE*, 5(4): e10171. doi:10.1371/journal.pone.0010171
- Lannfelt**, L., Axelman, K., Lilius, L., Basun, H. 1995. Genetic counseling in a Swedish Alzheimer family with amyloid precursor protein mutation. *American society of human genetics*, 52: 332- 335.
- Lee**, V., Goedert, M., Trojanowski, J. 2001. Neurodegenerative tauopathies. *Annual Reviews Neuroscience*, 24 (1): 121- 159.
- Liang**, Y., Tang, X. 2006. Comparative studies of huperzine A, donepezil, and rivastigmine on brain acetylcholine, dopamine, norepinephrine, and 5-hydroxytryptamine levels in freely-moving rats. *Acta pharmacologica sinica*, 27(9):1127- 1136.
- Linden**, A., Greene, S., Bergeron, M., Schoepp, D. 2004. Anxiolytic activity of the MGLU2/3 receptor agonist LY354740 on the elevated plus maze is associated with the suppression of stress-induced c- Fos in the hippocampus and increases in c- Fos induction in several other stress-sensitive. *Neuropsychopharmacology*, 29, 502- 513.
- Loftus**, G., Loftus, E. Human memory: the processing of information, Lawrence Erlbaum associates, USA, p. 34.
- Maroun**, M., Akirav, I. 2009. Differential involvement of dopamine D1 receptor and MEK signaling pathway in the ventromedial prefrontal cortex in consolidation and reconsolidation of object recognition memory. *Learning and memory*, 16: 243- 247.

Martins de Lima, M., Presti, J., Dornelles, A., Siciliani, F., Roesler, R., Atháide, V., Schröder, N. 2010. Modulatory influence of dopamine receptor on consolidation of object recognition memory. *Neurobiology of learning and memory*, Artículo en corrección.

Medicine World.org, your gateway to the world of medicine: <http://medicineworld.org/news/news-archives/health-news/June-27-2007.html>; consulta: enero, 2011.

McDonagh, S. 2003. Equipping and establishing a PCR Laboratory, en *PCR Protocols*, 2nd ed. Humana Press, USA.

McQuade, R., Creton, D., Stanford, S. 1999. Effect of novel environmental stimuli on rat behavior and central noradrenaline function measured by in vivo microdialysis. *Psychopharmacology*, 145: 393- 400.

Microdialysis company, CMA. <http://www.microdialysis.se/the-company/images-to-download>; consulta: enero, 2011.

Milner, B., Squire, L., Kandel., E. 1998. Cognitive neuroscience and the study of memory. *Neuron*, 20, 445- 468.

Miranda, I. 2007. Changes in neurotransmitter extracellular levels during memory formation, en Bermúdez, F., editor: *Neural plasticity and memory: from genes to brain imaging*, Ed. CRC Press.

Mora, F., Segovia, G., Del Arco, A. 2007. Aging plasticity and environmental enrichment: structural changes and neurotransmitter dynamics in several areas of the brain. *Brain research reviews*, 55: 78-88.

Nagai, T., Takuma, K., Kamei, H., Ito, Y., Nakamichi, N., Ibi, D., Nakanishi, Y., Murai, M., Mizoguchi, H., Nabeshima, T., Yamada, K. 2007. Dopamine D1 receptors regulate protein synthesis- dependent long- term recognition memory via extracellular signal- regulated kinase 1/2 in the prefrontal cortex. *Learning and memory*, 14: 117- 125.

Nivsarkar, M. & Banerjee, A. 2009. Establishing the probable mechanism of L-dopa in Alzheimer's disease management. *Acta Poloniae pharmaceutica- Drug research*, 66 (5): 483- 486.

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

Oddo, S., Caccamo, S., Shepherd, J., Murphy, M., Golde, T., Kaye, R., Metherate, R., Mattson, M., Akbari, Y & LaFerla, F. 2003(b). Triple-Transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular AB and synaptic dysfunction. *Neuron*, 39: 409-421.

Orlowska, M. 2004. Microdialysis of the brain structures: application in behavioral research on vasopressin and oxytocin. *Acta neurobiologiae experimentalis*, 64: 177- 188.

Pan, W., Yang, SY., Lin, SK. 2004. Neurochemical interaction between dopaminergic and noradrenergic neurons in the medial prefrontal cortex. *Synapse*, 53: 44- 52.

Parra, M., Abrahams, S., Logie, R., Méndez, L., Lopera, F., Della Sala, S. 2010. Visual short-term memory binding deficits in familial Alzheimer's disease. *Brain, Journal of neurology*, 133: 2702- 2713.

Paxinos, G., Keith, F. 2004. The mouse brain in stereotaxic coordinates, Academic Press, 2nd ed., California, USA.

Peña-Casanova, J. 2007. Neurología de la conducta y neuropsicología, Editorial médica Panamericana, España, p 51.

Pietropaolo, S., Feldon, J., Yee, B. 2008. Age- dependent phenotypic characteristics of a triple transgenic mouse model of Alzheimer disease. Behavioral neuroscience, 122 (4): 733- 747.

Pimplikar, S., Nixon, R., Robakis, N., Shen, J., Tsai, LH. 2010. Amyloid-independent mechanisms in Alzheimer's disease pathogenesis. The journal of neuroscience, 30 (45): 14946-14954.

Pudovkina, O., Kawahara, Y., Vries, J., Westerink, B. 2001. The release of noradrenaline in the locus coeruleus and prefrontal cortex studied with dual-probe microdialysis. Brain research 906: 38- 45.

Purves, D., Augustine, G., Fitzpatrick, D., Hall, W., LaMantia, A., McNamara, J., Williams, M. 2004. Neuroscience, 3rd edition, Sinauer Associates, USA.

Querfurth, H. & LaFerla, F. 2010. Mechanisms of disease: Alzheimer's disease. The new England journal of medicine, 362: 329-344.

Rudbeck, L., Dissing, J. 1998. Rapid, simple alkaline extraction of human genomic DNA from whole blood, buccal epithelial cells, semen and forensic stains for PCR. Biotechniques, 25: 588-592.

Querfurth, H. & La Ferla, F. 2010. Mechanisms of disease: Alzheimer's disease. The new England journal of medicine, 362: 329- 344.

Ramírez- Amaya, V. 2007. Chapter 3 Molecular mechanisms of synaptic plasticity underlying long term memory formation, en: Bermúdez- Rattoni, F., editor, Neural plasticity and memory: from genes to brain imaging, 1st ed., CRCpress; USA.

Reeves, S., Brown, R., Howard, R., Grasby, P. 2009. Increased striatal dopamine (D2/D3) receptor availability and delusions in Alzheimer disease. Neurology, 72: 528- 534.

Reeves, S., Mehta, M., Howard, R., Grasby, P., Brown, R. 2010. The dopaminergic basis of cognitive and motor performance in Alzheimer's disease. Neurobiology of disease, 37: 477- 482.

Ries, M., Schmitz, T., Kawahara, T., Torgerson, B., Trivedi, T., Johnson, S. 2009. Task-dependent posterior cingulate activation in mild cognitive impairment. Neuroimage, 29: 485- 492.

Roberson, E., Mucke, L. 2006. 100 Years and counting: prospects for defeating Alzheimer's disease. Science, 314: 781- 784.

Roosendaal, B., Castello, N., Vedana, G., Barsegyan, A., McGaugh, J. 2008. Noradrenergic activation of the basolateral amygdala modulates consolidation of object recognition memory: Neurobiology of learning and memory, 90: 576-579.

Rudbeck, L., Dissing, J. 1998. Rapid, simple alkaline extraction of human genomic DNA from whole blood, buccal epithelial cells, semen and forensic stains for PCR. Biotechniques, 25 (4): 588-590, 592.

Schliebs, R., Arendt, T. 2006. The significance of the cholinergic system in the brain during aging and in Alzheimer's disease. *Journal of neural transmission*, 113: 1625- 1644.

Shearman, E., Rossi, S., Szasz, B., Juranyi, Z., Fallon, S., Pomara, N., Sershen, H., Lajtha, A. 2006. Changes in cerebral neurotransmitters and metabolites induced by acute donepezil and memantine administrations: a microdialysis study. *Brain research bulletin*, 69: 204- 213.

Segovia, G., Del Arco, A., De Blas, M., Garrido, P., Mora, F. 2010. Environmental enrichment increases the in vivo extracellular concentration of dopamine in the nucleus accumbens: a microdialysis study. *Journal of neural transmission*, 117 (10): 1123- 1130.

Selkoe, D. 2001. Alzheimer's disease: genes, proteins and therapy. *Physiological reviews*, 81: 741- 766.

Siddiqui, M., Shuaib, A. 2001. Intracerebral Microdialysis and its clinical application: a review. *Methods*, 23, 83-94.

Siegel, G., Albers, W., Brady, S., Price, D. 2006. Basic neurochemistry, molecular, cellular, and medical aspects. Elsevier, Canadá.

Smith, C. 2002. Elements of molecular neurobiology, John Wiley & Sons, 3rd ed., England.

Squire, L., Berg, D., Bloom, F., Du Lac, S., Ghosh, A., Spitzer, N. 2008. Fundamental neuroscience, 3rd ed., Editorial Elsevier, Canadá, pp. 1062, 1063,

Squire, L., Kandel, E. 2009. Memory, from mind to molecules, Roberts & company publishers, 2nd ed., USA.

Sterniczuk, R., Antle, M., LaFerla, F., Dyck, R. 2010. Characterization of the 3xTg-AD mouse model of Alzheimer's disease: Part 2. Behavioral and cognitive changes. *Brain research*, 1348: 149- 155.

Teather, L., Magnusson, J., Chow, C., Wurtman, R. 2002. Environmental conditions influence hippocampus-dependent behaviours and brain levels of amyloid precursor protein in rats. *European journal of neuroscience*, 116: 2405- 2415.

Thompson, R. (2000). The brain: a neuroscience primer, Worth Publishers 3th ed., New York.

Tisdall, M., Smith, M. 2006. Cerebral microdialysis: research technique or clinical tool. *British journal of anaesthesia*, 97: 1, 18- 25.

Turner, P., O'Connor, K., Tate, W., Abraham, W. 2003. Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory. *Progress in neurobiology*, 70: 1- 32.

Whitehouse, P., Price, D., Clark, A., Coyle, J., DeLong, M. 1981. Alzheimer Disease: Evidence for selective loss of cholinergic neurons in the nucleus basalis. *Annals of neurology*, 10:122- 126.

Wilkinson, D. 1999. The pharmacology of donepezil: a new treatment for Alzheimer's disease. *Expert opinion on pharmacotherapy*, 1: 121- 135.

Williams, D. 2006. Tauopathies: classification and clinical update on neurodegenerative diseases associated with microtubule-associated protein tau. *Internal Medicine Journal*, 36: 652-660.

Winters, B., Bussey, T. 2005. Glutamate receptors in perirhinal cortex mediate encoding, retrieval, and consolidation of object recognition memory. *The journal of neuroscience*, 25: 17, 4243- 4251.

Winters, B., Saksida, L., Bussey, T. 2008. Object recognition memory: neurobiological mechanisms of encoding, consolidation and retrieval. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 32: 1055- 1070.

Wisman, L., Sahin, G., Maingay, M., Leanza, G., Kirik, D. 2008. Functional convergence of dopaminergic and cholinergic input is critical for hippocampus-dependent working memory. *The journal of neuroscience*, 28:31, 7797-7807.

Witter, M., Groenewegen, H., Lopes DA silva, F., Lohman, H. 1989. Functional organization of the extrinsic and intrinsic circuitry of the parahippocampal region. *Progress in neurobiology*, 33: 161- 253.

Woo, H., Baik, S., Park, J., Gwon, AR., Yang, S., Yun, YK., Jo, DG. 2010. Secretases as therapeutic targets for Alzheimer's disease. *Biochemical and Biophysical research communications*, 404: 1, 10- 15.

Xu, Y. 1996. Tutorial: capillary electrophoresis. *The chemical Educator*, 1(2): 1- 14.

Zhang, W., Yamada, M., Gomeza, J., Basile, A., Wess, J. 2002. Multiple muscarinic acetylcholine receptor subtypes modulate striatal dopamine release, as studied with M₁-M₅ muscarinic receptor knock-out mice. *The journal of neuroscience*, 22 (15): 6347- 6352.

X. ANEXO

Fotografías de los geles de agarosa 2% de la genotipificación para corroborar que los ratones 3xTg tuvieran los transgenes para APP-Tau y PS1. La imagen 1 muestra los geles para APP- *tau* (A), muestra una doble banda; y de PS1 (B), muestra una doble banda en el caso de las muestras digeridas con la enzima BSTEII. Los ratones sin doble banda tanto para APP- Tau como para PS1 son del genotipo WT.

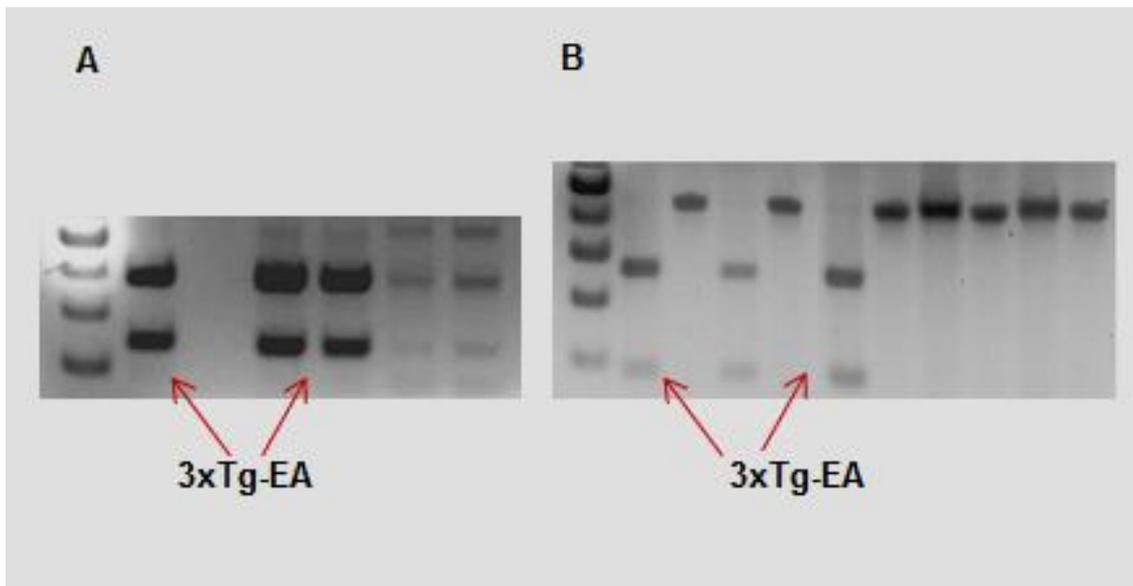


Imagen 1. Fotografías de geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio, A. APP- *tau*, B. PS1. Las flechas indican las bandas tanto para APP-*tau* como para PS1 en ratones con genotipo transgénico.

Análisis de ubicación de las cánulas guía, indicada en la imagen 2, en donde se ubica la corteza insular (A) e hipocampo (B).

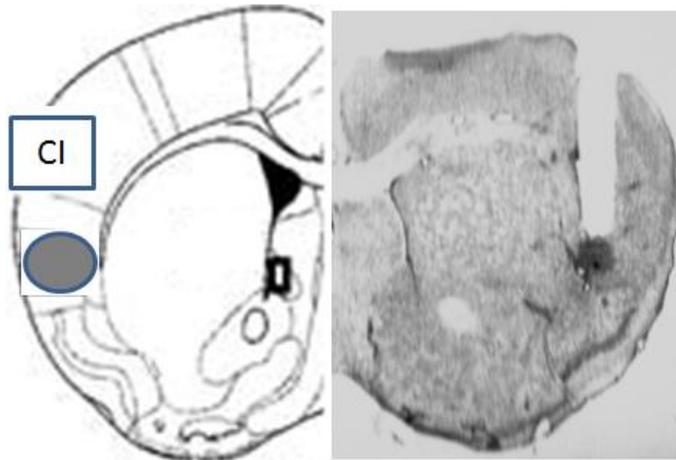


Imagen 2. Ubicación de las cánulas guía en A. Corteza insular (izquierdo imagen representativa; derecho, microfotografía)