



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Efecto del Bexaroteno sobre la plasticidad en la sinapsis comisural CA3→CA1 en un modelo murino de enfermedad de Alzheimer

Jonathan Mauricio Muñoz Cabrera

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Medicina

Bogotá, Colombia

2015

Efecto del Bexaroteno sobre la plasticidad en la sinapsis comisural CA3→CA1 en un modelo murino de enfermedad de Alzheimer

Jonathan Mauricio Muñoz Cabrera

Tesis de investigación presentada como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Neurociencias

Director:

Francisco Alejandro Múnera Galarza, MD, M.Sc, Ph.D.

Codirector:

Gonzalo Humberto Arboleda Bustos, MD, M.Sc, Ph.D.

Línea de Investigación:

Fisiología sináptica

Grupo de Investigación:

Neurofisiología Comportamental

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Medicina

Bogotá, Colombia

2015

A mis padres y hermanos

Por haber inculcado en mí, el maravilloso hábito del estudio. Sin ellos nada de esto sería posible.

“Como no estás experimentado en las cosas del mundo, todas las cosas que tienen algo de dificultad te parecen imposibles. Confía en el tiempo, que consigue dar dulces salidas a muchas amargas dificultades”

Miguel de Cervantes

Agradecimientos

Agradezco principalmente a la Universidad Nacional de Colombia y a los grupos de investigación de Neurofisiología Comportamental y Muerte Celular por prestar todo el apoyo para la realización de este trabajo. A mi profesor y codirector Gonzalo Arboleda por todo su apoyo y disposición para transmitir sus conocimientos y especialmente a mi amigo, tutor y maestro Alejandro Múnera quien con sus enseñanzas y valiosa ayuda para resolver todas las dudas, guió con éxito esta investigación. Además, agradezco a mis compañeros de laboratorio en especial a Tatiana Báez, Keydy Vásquez y Adrián Sandoval por su colaboración, enseñanzas y ayuda prestada en la realización de este trabajo.

A mi familia en especial a mis padres y hermanos por acompañarme y apoyarme en todo lo que me he propuesto en la vida, por entenderme en los momentos difíciles y por guiarme en las situaciones más complicadas. A mis amigos por su ayuda incondicional y por su compañía en estos años. Y finalmente a mi Dianita, por las buenas energías transmitidas durante todos los momentos y en especial durante los más estresantes.

Resumen

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un desorden neurodegenerativo que se caracteriza por un daño sináptico que conlleva a la pérdida neuronal y a déficits en la memoria. Neuropatológicamente se caracteriza por la formación y acumulación de placas extracelulares amiloides y ovillos neurofibrilares, formados respectivamente por el péptido amiloide- β ($A\beta$), y de la proteína Tau en estado hiperfosforilado. Estudios con modelos murinos transgénicos que imitan la patología muestran que los oligómeros del péptido $A\beta$ y de la proteína Tau, estarían involucrados en el daño sináptico y neuronal. El bexaroteno, un agonista de receptores RXR, parece revertir la neurodegeneración, disminuir los niveles del péptido $A\beta$ y mejorar la cognición en modelos murinos de EA. Esto permitió especular que el bexaroteno está involucrado en procesos que mejoran la eficiencia sináptica, por lo cual es importante estudiar los efectos de este fármaco sobre la transmisión y plasticidad sináptica. Se utilizaron ratones senescentes triple transgénicos para la enfermedad de Alzheimer (3xTG-AD), y ratones *wild type* a los cuales se les administró bexaroteno o vehículo por 28 días. Se realizaron registros electrofisiológicos *in vivo* de la respuesta neuronal de la región CA1 del hipocampo provocada por la estimulación eléctrica de la región CA3 del hipocampo contralateral, y se evaluó la transmisión sináptica basal y los procesos de plasticidad sináptica de esta sinapsis. Se encontró que la estimulación eléctrica en la región CA3, produce una respuesta Postsináptica Excitadora (PSE) extracelular en las neuronas de la región CA1 del hipocampo contralateral. Esta respuesta PSE es similar en forma en todos los animales, pero de menor amplitud en los animales 3xTG-EA. Además la respuesta PSE presenta procesos de plasticidad sináptica como potenciación a largo plazo (LTP) y facilitación por pulsos emparejados. Finalmente se encontró que la respuesta postsináptica PSE, al igual que sus

procesos de plasticidad sináptica, se encuentran disminuidos en los ratones 3xTG-EA. Sin embargo, el tratamiento con bexaroteno, permite la recuperación de la respuesta PSE y sus procesos de plasticidad sináptica. Estos hallazgos sugieren que el bexaroteno está implicado en el mejoramiento de la actividad sináptica en los ratones senescentes 3xTG-EA. Aunque los mecanismos de acción del bexaroteno no son claros, se sabe que puede actuar a nivel de la transcripción de proteínas (ApoE y ABCA1) involucradas en los procesos de degradación natural del péptido A β ; así como a nivel sináptico en la prevención de la formación de canales amiloidogénicos tóxicos para la neurona.

Palabras Clave

Ratones 3xTG-EA, electrofisiología, hipocampo, enfermedad de Alzheimer, bexaroteno, plasticidad sináptica.

Abstract

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disorder characterized by synaptic failure that leads to neuronal loss and memory deficits. Neuropathological, it is feature by the formation and accumulation of extracellular amyloid plaques and neurofibrillary tangles, composed by amyloid- β peptide ($A\beta$), and hyperphosphorylated tau protein, respectively. Studies with transgenic mouse models imitating the pathology show that the oligomers of the peptide $A\beta$ and tau protein might be involved in the synaptic and neuronal failure. Bexarotene, an agonist of RXR receptors, appears to reverse neurodegeneration, decrease $A\beta$ levels and improve cognition in murine models of AD. This leads to bexarotene is involved in synaptic processes that improve efficiency, so it is important to study the effects of this drug on synaptic transmission and plasticity. Triple transgenic for Alzheimer's disease (3xTg-AD) and wild type mice treated or not with bexarotene were used. In vivo electrophysiological recordings recorded the neural activity in hippocampal CA1 region induced by electrical stimulation of the CA3 region of the contralateral hippocampus. Basal synaptic transmission and synaptic plasticity was assessed. It found that electrical stimulation in the CA3 region produces an excitatory postsynaptic response in the neurons of CA1 region. This response is similar in shape in all animals but in the lower amplitude in 3xTg-EA animals. This response presented synaptic plasticity processes as long-term potentiation (LTP) and paired pulse facilitation. Finally, it found that the postsynaptic response, as synaptic plasticity processes, are reduced in 3xTg-EA mice. However, treatment with bexarotene, allowing recovery of the response and synaptic plasticity processes. These findings suggest that bexarotene involved in enhance synaptic activity in senescent 3xTg-EA mice. Although the action mechanisms of bexarotene are unclear, it known that it can act at the level of transcription proteins involved in

the processes of natural degradation of A β (ApoE and ABCA1) and at synaptic level by prevention in the formation of toxic amyloidogenic channels.

Keywords

3xTg-AD mice, electrophysiology, hippocampus, Alzheimer's disease, bexarotene, synaptic plasticity

Contenido

RESUMEN	5
ABSTRACT	7
LISTA DE FIGURAS	12
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	13
1. DEFINICIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	15
2. OBJETIVOS	17
General	17
Específicos	17
3. MARCO TEÓRICO	18
3.1 Enfermedad de Alzheimer	18
3.2 Neuropatología de la enfermedad de Alzheimer	19
3.2.1 Hipótesis colinérgica	19
3.2.2 Hipótesis de la proteína Tau hiperfosforilada	19
3.2.3 Hipótesis de la cascada amiloide	20
3.2.3.1 APP y su función	21
3.2.3.2 Procesamiento de APP	21
3.2.3.3 Estructura y función de β -amiloide	22
3.2.3.4 Mecanismo de neurotoxicidad de $A\beta$.	23

3.3 Receptores nucleares de tipo RXR (Retinoid X receptors) y su papel en EA	23
3.4 Modelo animal Triple transgénico 3xTg-EA	25
3.5 Sistema hipocámpico	26
3.6 Circuitería Hipocámpica	27
3.7 Alzheimer y mecanismos de plasticidad sináptica	28
3.7.1 Plasticidad sináptica a corto plazo	28
3.7.1.1 Mecanismos moleculares de la facilitación	29
3.7.1.2 Mecanismos moleculares de la defacilitación	29
3.7.2 Plasticidad sináptica a largo plazo	30
3.7.3 Efecto del β -amiloide sobre la plasticidad sináptica	31
4. MATERIALES Y MÉTODOS	33
4.1 Sujetos experimentales	33
4.2 Diseño experimental	34
4.3 Preparación y administración del fármaco	35
4.4 Procedimiento quirúrgico	35
4.5 Electrodo	37
4.6 Estimulación	37
4.7 Registro en la región CA1 del hipocampo	38
4.8 Verificación histológica del emplazamiento de los electrodos	38
4.9 Procesamiento de datos	38
4.10 Análisis estadístico	40

5. RESULTADOS -----	41
5.1 Respuesta postsináptica en CA1 provocada por estimulación de CA3 contralateral -----	41
5.2 Plasticidad por pulsos emparejados -----	46
5.3 Potenciación a largo plazo -----	49
5.3.1 Línea de base-----	49
5.3.2 Cambio en la relación I/O-----	49
5.3.3 Cambio en la amplitud máxima de la respuesta PSE-----	52
6. DISCUSIÓN -----	56
7. CONCLUSIONES -----	62
8. PERSPECTIVAS -----	63
9. ANEXO 1. ESQUEMA REPRESENTATIVO DE LOS LUGARES DE LA ESTIMULACIÓN Y DEL REGISTRO -----	64
10. BIBLIOGRAFÍA -----	65

Lista de figuras

Figura 1. Esquema ilustrativo de las vías de procesamiento de APP.

Figura 2. Esquema ilustrativo de las principales conexiones sinápticas de la formación hipocámpica.

Figura 3. Esquema representativo de la preparación experimental.

Figura 4. Registro extracelular de las respuesta postsináptica excitadora (PSE) en la sinapsis comisural CA3→CA1 y su variación en función del emplazamiento relativo del electrodo de registro.

Figura 5. La intensidad del estímulo modificó la respuesta PSE en la sinapsis comisural CA3→CA1 en el hipocampo de ratones control (*Wild-type* tratados con vehículo, WT-Veh).

Figura 6. El fenotipo y el tratamiento farmacológico modificaron la transmisión sináptica basal en la sinapsis comisural CA3→CA1 en el hipocampo.

Figura 7. El fenotipo y el tratamiento farmacológico modificaron la plasticidad por pulsos emparejados en la sinapsis comisural CA3→CA1 en el hipocampo.

Figura 8. El fenotipo y el tratamiento farmacológico modificaron la potenciación a largo plazo en la sinapsis comisural CA3→CA1 en el hipocampo I: curvas I/O.

Figura 9. El fenotipo y el tratamiento farmacológico modificaron la potenciación a largo plazo en la sinapsis comisural CA3→CA1 en el hipocampo II: cambio en la pendiente de la curva I/O.

Figura 10. El fenotipo y el tratamiento farmacológico modificaron la potenciación a largo plazo en la sinapsis comisural CA3→CA1 en el hipocampo III: evolución temporal de la amplitud de la respuesta PSE.

Lista de símbolos y abreviaturas

Símbolo o abreviatura	Término
μA	Microamperios
3xTG-EA	Modelo murino triple transgénico para la enfermedad de Alzheimer
ABC	Área bajo la curva
ABCA1	Transportador A1 de unión al ATP
AMPA	Receptor del ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico
ApoE	Apolipoproteína E
APP	Precursor de la proteína amiloide
A β	Amiloide beta
BXT	Bexaroteno
CA1	Cornu Ammonis 1
CA2	Cornu Ammonis 2
CA3	<i>Cornu Ammonis 3</i>
EA	Enfermedad de Alzheimer
HFS	Estimulación a alta frecuencia
IEE	Intervalo entre estímulos
LDLR	Receptores de lipoproteínas de baja densidad
LTD	Depresión a largo plazo
LTP	Potenciación a largo plazo
LXR	Receptores X del hígado
$M_{a,i}$	Pendiente máxima de la regresión logarítmica antes de la inducción
$M_{d,i}$	Pendiente máxima de la regresión logarítmica después de la inducción
mV	milivoltios
NMDA	Receptor N-metil-D-aspartato
PP	Pulsos emparejados

PPA γ	Receptor γ activado por el proliferador peroximal
PS1	Presenilina 1
PS2	Presenilina 2
R_2/R_1	Cociente entre la amplitud máxima de la respuesta PSE al segundo pulsos y la amplitud máxima al primer pulso
REC	Registro
Respuesta PSE	Respuesta postsináptica excitadora extracelular
RXR	Receptor X retinoide
STM	Estimulación
TG-BXT	Ratones 3xTG-Ea tratados con bexaroteno por 28 días
TG-Veh	Ratones 3xTG-EA tratados con vehículo por 28 días
VEH	Vehículo
WT-BXT	Ratones wild type tratados con bexaroteno por 28 días
WT-Veh	Ratones <i>wild type controles</i>

1. Definición y planteamiento del problema

La enfermedad de Alzheimer (EA) es considerado actualmente como un problema de salud pública que aumenta progresivamente con la edad (Schellenberg & Montine, 2012). Debido a su variabilidad neurofisiología se han estipulado muchas hipótesis para explicar la neuropatología observada, entre las que se encuentran: la hipótesis colinérgica, la hipótesis de la proteína Tau, la hipótesis de la cascada amiloide, entre otras (Zhang, Thompson, Zhang, & Xu, 2011; Dumas & Newhouse, 2011; Andrew & Ottavio, 2012; & Pooler, Noble, & Hanger, 2014). En la actualidad la hipótesis de la cascada amiloide es la más estudiada y aceptada. Esta hipótesis explica que la pérdida neuronal y la deficiencia sináptica se deben a la acumulación de proteína amiloide beta ($A\beta$), tanto a nivel extraneuronal como intraneuronal, la cual promueve la hiperfosforilación de la proteína Tau con la posterior formación de ovillos neurofibrilares (Andrew & Ottavio, 2012); de esta forma se incrementa drásticamente un ambiente nocivo para la neurona conllevando a la muerte de la misma.

En modelos animales amiloidogénicos, es decir aquellos que solo presentan placas amiloides, los agonistas de receptores nucleares RXRs han mostrado que pueden revertir el deterioro cognitivo y presentar mejorías fisiopatológicas y bioquímicas. En estos modelos se ha demostrado que el mecanismo de acción de estos fármacos, es el incremento de la vía de degradación proteolítica de las placas amiloides, mediadas por el incremento de la lipidadión de la apolipoproteína E (Kang & Rivest, 2012); sin embargo, el estudio es parcial, ya que estos modelos no presentan ninguna patología relacionada con la proteína Tau y se desconoce la eficiencia de los agonistas en otros modelos murinos como el triple transgénico para la enfermedad de Alzheimer (3xTG-EA).

Estudios recientes del grupo de Muerte Neuronal de la Universidad Nacional de Colombia han mostrado que ratones triple transgénicos (3xTG-EA) tratados durante 15 días con bexaroteno (100mg/kg/día), un agonista de receptores nucleares RXR, muestran una mejoría en la prueba comportamental del laberinto acuático de Morris, un modelo específico para evaluar mecanismos de memoria. Una de las estructuras del cerebro más relacionadas con procesos de consolidación de la memoria es el hipocampo. Con base en estos resultados se pretende evaluar la actividad sináptica basal y los procesos de plasticidad sináptica en las neuronas de la región CA1 del hipocampo en ratones *wild type* o 3xTG-EA, tratados o no, con bexaroteno (agonista de receptores nucleares RXRs). Así, el presente trabajo tratará de correlacionar los resultados comportamentales con resultados electrofisiológicos encontrados en ratones 3xTG-EA tratados con bexaroteno. Además los resultados encontrados en esta investigación, ayudarían a proponer un posible mecanismo de acción del fármaco que permitiría explicar los cambios en las propiedades electrofisiológicas de las neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo y así proponer un tratamiento farmacológico alternativo para la reversión del déficit cognitivo visto en EA.

2. Objetivos

General

Caracterizar el efecto del bexaroteno sobre las propiedades basales y la plasticidad a largo plazo de la sinapsis comisural CA3→CA1 del hipocampo en ratones senescentes silvestres y triple-transgénicos para Alzheimer.

Específicos

- Poner a punto las preparaciones fisiológicas para registrar en la región CA1 del hipocampo las respuestas sinápticas provocadas por estimulación de la región CA3 del hipocampo del hemisferio contralateral.
- Caracterizar la respuesta de CA1 del hipocampo ante estimulaciones de intensidad creciente en la región CA3 del hipocampo del hemisferio contralateral.
- Caracterizar en la región CA1 del hipocampo la plasticidad sináptica de las entradas sinápticas procedentes desde la región CA3 del hipocampo del hemisferio contralateral.
- Caracterizar la interacción del bexaroteno y el genotipo (silvestre y 3xTg-EA) sobre la transmisión sináptica basal y la plasticidad sináptica a largo plazo en la sinapsis comisural CA3→CA1 del hipocampo en ratones senescentes.

3. Marco teórico

3.1 Enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer (EA) al igual que otras enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson o la esclerosis lateral amiotrófica, representan un gran reto para las investigaciones biomédicas debido a que parte de su neuropatofisiología no se conoce en su totalidad. La EA se caracteriza principalmente por la pérdida neuronal, la atrofia cerebral y la pérdida progresiva de la memoria. A nivel neuropatológico se distinguen dos principales características: 1) la acumulación extracelular de placas que contienen depósitos del péptido A β ; 2) la acumulación intracelular de neurofibrillas que contienen la proteína Tau en su forma hiperfosforilada (Sun, Jin, & Ling, 2012) (Oddo, Caccamo, & Shepherd, 2003). Epidemiológicamente se ha establecido que la EA es la forma más común de demencia senil, la cual afecta al 10% de la población mundial mayor de 65 años, y al 50% de la población mayor de 85 años (Zhang *et al.*, 2011). Entre la sintomatología más común de los pacientes que sufren la enfermedad, se puede observar la pérdida de la memoria, confusión, desorientación y problemas para expresarse; todo esto debido principalmente a la pérdida neuronal y al daño sináptico ocurrido en estructuras como el hipocampo y la corteza cerebral (Boutajangout & Wisniewski, 2013). Los factores de riesgo que están asociados a la presencia de la neuropatología son:

- La mutación de tres genes,: el gen precursor de la proteína amiloide (APP), la presenilina 1 (PS1), y la presenilina 2 (PS2); todos asociados a casos mendelianos de la enfermedad,
- Presentar el alelo 4 para apolipoproteína E (ApoE4),

- Factores ambientales como la vejez, el trauma cerebral, la diabetes tipo 2 y la hipertensión, entre otros (Zhang *et al.*, 2011; Schellenberg & Montine, 2012).

3.2 Neuropatología de la enfermedad de Alzheimer

Aunque la neuropatología de la EA es muy compleja, y no se comprende en su totalidad, existen algunas hipótesis que tratan de explicar los mecanismos moleculares asociados a la enfermedad. Entre las hipótesis más acertadas y completas están: la disfunción colinérgica en el sistema nervioso central, la acumulación de proteína Tau hiperfosforilada, y la hipótesis de la cascada amiloide (Sun *et al.*, 2012). Ellas intentan explicar dos de las principales consecuencias del Alzheimer: la disfunción y la pérdida de las conexiones sinápticas, que conllevan finalmente a la atrofia cerebral y cognitiva en los pacientes con EA (Pooler *et al.*, 2014).

3.2.1 Hipótesis colinérgica

Desde el año 1982, Bartus y colegas propusieron la hipótesis colinérgica, la cual propone la existencia de una perturbación funcional en la actividad colinérgica en el sistema nervioso central tanto de personas adultas sanas como en pacientes con Alzheimer (Dumas & Newhouse, 2011). Esta perturbación conlleva a la pérdida de la memoria y a problemas cognitivos debido principalmente a la gran pérdida de neuronas colinérgicas en áreas del cerebro asociadas a la memoria y al aprendizaje, como son: el hipocampo, los núcleos basales de Meynert y la corteza cerebral (Sun *et al.*, 2012). La base de esta hipótesis se centra en estudios los cuales mostraban que cerebros de pacientes con EA tienen niveles muy bajos de acetilcolina, influyendo negativamente en la actividad colinérgica vista en el sistema nervioso central, que conlleva a un déficit cognitivo (Dumas & Newhouse, 2011).

3.2.2 Hipótesis de la proteína Tau hiperfosforilada

La hipótesis de la proteína Tau hiperfosforilada surgió de diferentes observaciones en las cuales se mostraba que los cerebros de pacientes con EA, además de tener los típicos depósitos de placas amiloides, tenían la presencia de ovillos de

neurofibrillas de proteína Tau. Debido a esta hipótesis, se ha demostrado que el deterioro en las conexiones sinápticas no solamente se debe a la acumulación de placas amiloides, sino al papel fundamental de la proteína Tau en la sinapsis. En personas sanas se observa que la proteína Tau en estado fosforilado se encuentra localizada en los microtúbulos, y tiene como función la unión y estabilización de dichos microtúbulos. La proteína Tau está involucrada en los procesos dinámicos de los microtúbulos, específicamente, esta proteína estabiliza a la proteína tubulina y permite la polimerización de los microtúbulos. Estudios recientes han demostrado que Tau se localiza en la estructura sináptica, ya sea en la región pre-sináptica o la región post-sináptica, donde interactúa con los filamentos de F actina y puede modificar la estructura de las espinas dendríticas (Pooler *et al.*, 2014). Además se ha observado que Tau se puede unir con proteínas como PSD-95, la cual es muy importante para el anclaje de receptores NMDA y por ende para regular los mecanismos de plasticidad sináptica (Kornau *et al.*, 1995). Estudios recientes han concluido que ratones que sobre-expresan la proteína Tau y no forman ovillos neurofibrilares, presentan una gran degeneración sináptica, lo cual ha sugerido que Tau soluble está actuando como una especie sinaptotóxica (Pooler *et al.*, 2014)

3.2.3 Hipótesis de la cascada amiloide

Una de las hipótesis más aceptadas en el campo científico para la EA, es la hipótesis denominada de la cascada amiloide. Ésta hipótesis establece que la deposición de β -amiloide ($A\beta$) en el espacio extracelular, es el evento central de la etiología de la EA; dicho depósito de $A\beta$ es la que conlleva a la patología de Tau y a la posterior muerte neuronal (Andrew & Ottavio, 2012). La base principal para desarrollar esta hipótesis se estableció con los estudios de genoma completo, los cuales han permitido demostrar que las mutaciones de genes como el de la proteína precursor amiloide (APP), la presenilina 1 y 2 (PS1, PS2), están implicados en la aparición de la enfermedad ya que presentan un papel muy importante en el procesamiento proteolítico de la proteína precursora amiloide (APP) (Schellenberg & Montine, 2012) .

3.2.3.1 APP y su función

En seres humanos el gen para APP se ubica en el cromosoma 21 y puede presentarse en tres isoformas que dependen del procesamiento que sufra su mRNA por splicing alternativo; estas isoformas pueden ser: APP695, APP751, y APP770 (Sun *et al.*, 2012). Cada una de estas isoformas se caracteriza por formar proteínas transmembranales las cuales presentan un dominio A β . Cada una de estas isoformas presenta características distintivas, por ejemplo, la APP751 y APP770, tienen 751 y 770 aminoácidos respectivamente y se localizan en todos los tejidos presentando un dominio de 56 aminoácidos en el lado extracelular denominado KPI (dominio inhibidor de proteasas Kunitz). Por otro lado la proteína APP695, que contiene 695 aminoácidos, se expresa predominantemente en las neuronas y carece de dominio KPI (Zhang *et al.*, 2011). La función principal de APP no ha sido especificada, sin embargo se sugiere que puede actuar en el crecimiento de neuritas, la sinaptogénesis, en el tráfico de proteínas neuronales a través del axón, en la transducción de señales, la adhesión celular y en el metabolismo del calcio (Zhang *et al.*, 2011).

3.2.3.2 Procesamiento de APP

En la EA, el APP es muy importante debido al procesamiento catalítico que sufre formando el péptido β -amiloide. La APP puede ser procesada en dos pasos diferentes por tres enzimas: α -secretasa, β -secretasa (BACE) y γ -secretasa, lo que permite la formación de distintos tipos de productos (Sun *et al.*, 2012). En estado fisiológico existe una homeostasis entre la vía amiloidogénica (que finaliza con la producción del péptido A β) y la vía no amiloidogénica (que finaliza con la producción de moléculas que son degradadas por la célula); pero durante el estado patológico la homeostasis se rompe y se inclina por la producción de A β (Zolezzi, Bastías-Candia, Santos, & Inestrosa, 2014). De manera general, en el primer paso de las vías, la APP puede ser clivada por α -secretasa (vía no amilodogénica) o por β -secretasa (vía amiloidogénica) (BACE), generando respectivamente dos fragmentos N-terminales denominados sAPP- α y sAPP- β , y dos fragmentos C-terminal denominados respectivamente C83 y C99. Posteriormente los fragmentos

C-terminales serán clivados por la enzima γ -secretasa, generando dos productos los cuales, dependiendo del procesamiento anterior, pueden formar lo siguiente: si los fragmentos provienen del procesamiento por α -secretasa se generaran los productos AICD (del inglés *APP intracelular domain*) y la proteína P3; por otro lado, si el procesamiento viene por la vía de la β -secretasa se generará el producto AICD y la proteína β -amiloide (Figura 1) (Andrew & Ottavio, 2012).

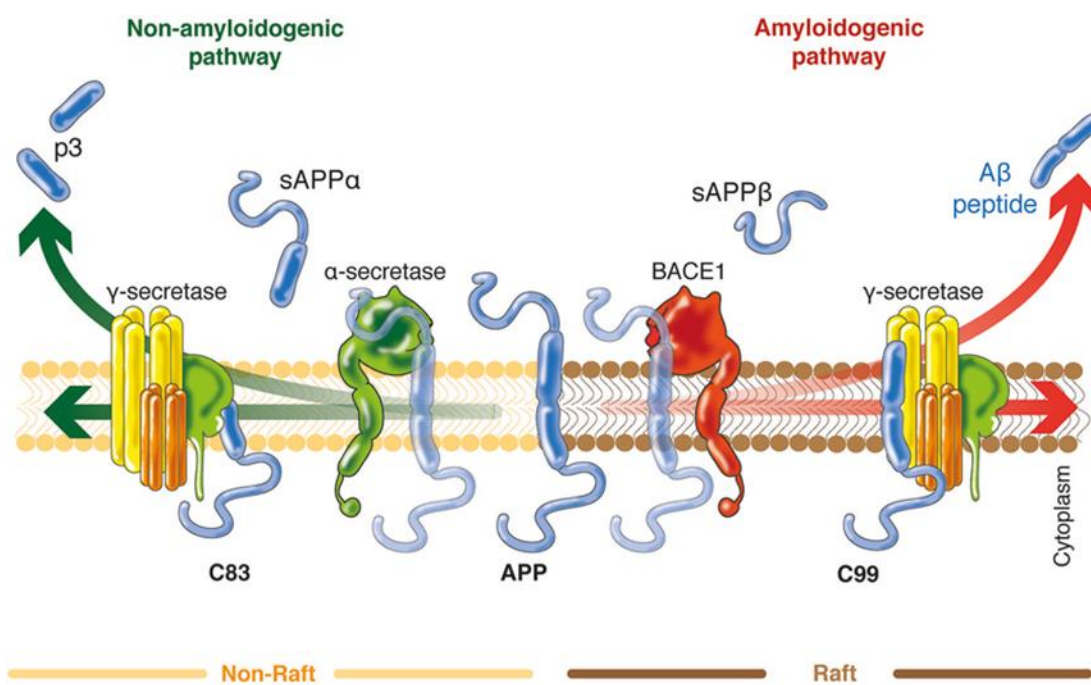


Figura 1. Esquema ilustrativo de las vías de procesamiento de APP. Tomado de Zolezzi *et al.*, 2014

3.2.3.3 Estructura y función de β -amiloide

El A β es un péptido de 40 residuos con un peso molecular de 4.000 Da. Existen dos formas de A β los cuales se diferencian en la estructura de su cola C-terminal, A β_{40} y A β_{42} , siendo este último mucho más propenso a agregarse y ser más neurotóxico (Sun *et al.*, 2012). Aunque la mayoría de A β es secretado hacia el espacio extracelular, se ha encontrado que en muchos compartimentos celulares, como el aparato de Golgi o el retículo endoplasmático e incluso la mitocondria, se

puede almacenar ciertos niveles de A β . Todo esto ha llevado a hipotetizar que la acumulación de A β dentro de la célula, específicamente en neuronas, puede contribuir a la patogénesis de la EA. En pacientes con daño cognitivo moderado, se ha concluido que hay presencia de A β intracelular en regiones como el hipocampo y la corteza entorrinal (Zhang *et al.*, 2011).

Aunque siempre se ha relacionado al A β como una especie anormal y tóxica, descubrimientos recientes han mostrado que A β se encuentra de forma soluble en los fluidos sanguíneos de varias especies. En estas se observa que bajos niveles de A β (alrededor de los picomolares) pueden incrementar la potenciación a largo plazo en el hipocampo y mejorar la memoria. Esto ha sugerido un nuevo papel fisiológico para el A β en la neurotransmisión y la memoria (Zhang *et al.*, 2011)(Sun *et al.*, 2012).

3.2.3.4 Mecanismo de neurotoxicidad de A β .

La acumulación de A β a nivel extracelular causa daño y pérdida de las conexiones sinápticas entre las neuronas. Los mecanismos moleculares para este daño aun no son claros, sin embargo se cree que el calcio (Ca²⁺) juega un papel predominante. El Ca²⁺ es un segundo mensajero celular, cuya concentración en el interior de la célula es mucho menor que la concentración extracelular. Se ha visto que A β puede alterar los canales de calcio en la membrana celular, incrementando el influjo de calcio y causando un desequilibrio. Ésta sobrecarga de calcio en el interior de la célula puede dañar orgánulos como el retículo endoplasmático o la mitocondria, conllevando a un proceso de muerte celular, y otros efectos como la peroxidación de lípidos y la generación de radicales libres (Sun *et al.*, 2012).

3.3 Receptores nucleares de tipo RXR (Retinoid X receptors) y su papel en EA

Los receptores nucleares son factores de transcripción que se activan con la unión a un ligando. Existen diferentes tipos de receptores y se caracterizan ya sea por estar unidos o no al DNA y por la presencia de activadores o represores (Lefebvre, Benomar, & Staels, 2010). Los receptores RXR, pertenecen al subgrupo de receptores de tipo II, los cuales son factores de transcripción ligando-dependientes

que se encuentran unidos al ADN, y proveen un importante vínculo entre el ambiente y el genoma. De manera general, todos los receptores nucleares deben dimerizarse para funcionar correctamente, para esto existen diferentes formas, pero las más importantes son los heterodímeros formados por los receptores RXR con receptores LXR (RXR:LXR) o con receptores PPAR γ (RXR: PPAR γ) (Sodhi & Singh, 2014). Estos receptores desempeñan un papel muy importante en diversas rutas de señalización que incluyen el desarrollo y el metabolismo (Mandrekar-Colucci & Landreth, 2011). Entre los receptores nucleares más importantes se encuentran los llamados de tipo II, que son:

- El receptor γ activado por el Proliferador Peroxisomal (PPAR γ del inglés *Peroxisome proliferator-activated receptor γ*);
- El receptor X del hígado (LXR del inglés *Liver X receptors*). La activación de estos receptores con agonistas, aminoran o reducen la patogénesis en modelos animales para EA (Kang & Rivest, 2012).

Estos dos receptores tienen que formar heterodímeros con los receptores X retinoicos (RXR del inglés *Retinoid X receptors*), formando un factor transcripcional funcional, el cual puede unirse a elementos de respuesta específicos (LXRE o PPRE), que promueven la regulación de genes específicos (Mandrekar-Colucci & Landreth, 2011).

Con el descubrimiento de potenciales factores de riesgo para EA [por ejemplo la presencia del alelo 4 de la apolipoproteína E (ApoE)], se abrió una nueva rama de investigación de la neuropatología de la EA involucrada con el metabolismo de lípidos. La ApoE es una lipoproteína secretada de 34 kDa y 299 aminoácidos de mayor expresión en el sistema nervioso central, que se une a los receptores de la familia LDLR (del inglés *low density lipoprotein receptor*), y funciona en el transporte de los lípidos (como el colesterol) entre las células (Kang & Rivest, 2012). En las células, la homeóstasis del colesterol es muy importante ya que permite el normal funcionamiento celular y fisiológico. Diferentes investigaciones han mostrado que la alteración en la homeóstasis del colesterol es importante en la iniciación y

desarrollo de la EA, ya que la cantidad de lípidos procesados por ApoE resulta significativa para el metabolismo de A β (Mandrekar-Colucci & Landreth, 2011).

La proteína ApoE actúa como una proteína de andamiaje que permite la formación de moléculas compuestas por lipoproteínas de alta densidad (HDL), las cuales funcionan en el transporte de lípidos y colesterol a través del cuerpo y el cerebro. En el cerebro, ApoE es sintetizada y secretada principalmente por los astrocitos, y en menor medida por la microglía. La unión de la proteína ApoE a los lípidos es llevada a cabo principalmente por la acción de la proteína ABCA1 (del inglés *ATP-binding cassette transporter A1*), la cual se encarga de cargar a la proteína ApoE con fosfolípidos y colesterol (Donkin *et al.*, 2010). La unión de lípidos a ApoE permite las interacciones con receptores celulares e interacción con el A β (Koldamova, Lefterov, Lefterova, & Lazo, 2001). Además se ha demostrado que los RXR, induce la expresión de ApoE y ABCA1, que ejercen su efecto sobre el A β (Mandrekar-Colucci & Landreth, 2011). Estudios recientes han mostrado que animales transgénicos para la enfermedad de Alzheimer, los cuales tienen déficits cognitivos principalmente a nivel de memoria y aprendizaje, cuando son tratados con bexaroteno, un agonista de receptores RXR, incrementan su desempeño en tareas comportamentales para la medición de memoria y aprendizaje. Este mejoramiento se ve acompañado por la disminución de especies solubles e insolubles de A β en el cerebro del animal. El aclaramiento que sufre el A β , se debe al incremento en la producción de ApoE, ABCA1 y ABCG1, moléculas sumamente importantes en procesos de proteolíticos de degradación del A β (Cramer *et al.*, 2012).

3.4 Modelo animal Triple transgénico 3xTg-EA

El modelo de ratón triple transgénico para enfermedad de Alzheimer (3xTg-EA) presenta mutaciones en tres genes distintos: PS1 (M146V); APP (Swe); y tau (P301L), lo cual se relaciona muy bien con la neuropatología de EA formando placas amiloides y de ovillos neurofibrilares. La obtención de este modelo animal se logró realizando microinyecciones dentro de un embrión de célula simple

proveniente de ratones knock-in homocigóticos para PS1 (M146V), de dos transgenes específicos: APP (Swe) y tau (P301L), con lo que se aseguró la similitud del background genético de los ratones. Estos animales, de manera dependiente a la edad y progresivamente, desarrollan placas amiloides y ovillos neurofibrilares, así como disfunción en la transmisión sináptica y déficit en los procesos de plasticidad sináptica como la potenciación a largo plazo (LTP). Debido a que estos daños en la función sináptica ocurren mucho antes de la aparición de placas y ovillos, y debido a que este modelo animal es el primero que muestra tanto la patología por las placas A β , así como la patología producida por los ovillos neurofibrilares en regiones del cerebro afectadas por la enfermedad de Alzheimer como el hipocampo, la corteza cerebral y la amígdala, es óptimo para el estudio de terapias con moléculas sintéticas, como por ejemplo los agonistas de receptores nucleares de tipo RXRs (Oddo *et al.*, 2003)

3.5 Sistema hipocámpico

Las deficiencias comportamentales en animales con lesión cerebral han sugerido la importancia del hipocampo o la formación hipocámpica en procesos de memoria y aprendizaje. Estos procesos son debidos a los cambios estructurales y funcionales ocurridos en el hipocampo como la potenciación a largo plazo (LTP del inglés *Long term Potentiation*); la remodelación sináptica y la producción *de novo* de neuronas en la fascia dentada (Mu & Gage, 2011). La formación hipocámpica se puede entender como un complejo cortical tridimensional, en el cual la información es procesada tanto por las unidades que se forman en el eje transversal, como por las unidades que se forman en el eje longitudinal. La formación hipocámpica se compone de estructuras cerebrales como son: la fascia dentada, el propio hipocampo (compuesto por las regiones CA1, CA2 y CA3), el subículo y la corteza entorrinal; todas y cada una de estas estructuras se relacionan específicamente de tal forma que su integridad funcional depende de las conexiones neuronales existentes entre dichas estructuras (Witter, 1993).

3.6 Circuitería Hipocámpica

De manera general la circuitería hipocámpica se podría resumir de la siguiente manera: la corteza entorrinal provee la principal fuente de entradas al hipocampo a través de conexiones con la fascia dentada. Posteriormente la información fluye de manera secuencial desde la circunvolución dentada hacia las regiones CA3 y CA1, donde se proyecta al subículo y forma las salidas del hipocampo con rumbo a las capas más profundas de la corteza entorrinal (Coulter *et al.*, 2011). Las dos principales entradas corticales desde la corteza entorrinal al hipocampo son: La vía perforante (PP del inglés *Perforant pathway*), y la vía temporoamónica (TP del inglés *Temporoammonic pathway*). La vía perforante se origina en la capa II de la corteza entorrinal, sus axones inervan principalmente las neuronas de la fascia dentada; a continuación las neuronas de la fascia dentada inervan neuronas de la región CA3 del hipocampo a través del sistema de las fibras musgosas (MF del inglés *mossy fibers*); y finalmente las neuronas de CA3 proyectan axones que van hacia la región CA3 contralateral, así como colaterales hacia la región CA1 ipsilateral, denominadas las colaterales de Schaffer (Figura 2) (Witter, 1993).

Por otro lado la vía temporoamónica se origina desde la capa III de la corteza entorrinal hacia las neuronas de la región CA1 del hipocampo donde están sus principales salidas. Por un lado CA1 puede proyectar al subículo y este nuevamente proyecta a las capas más profundas de la corteza entorrinal; por otro lado, CA1 puede proyectar directamente hacia las capas más profundas de la corteza entorrinal (Figura 2) (Witter, 1993; Coulter *et al.*, 2011).

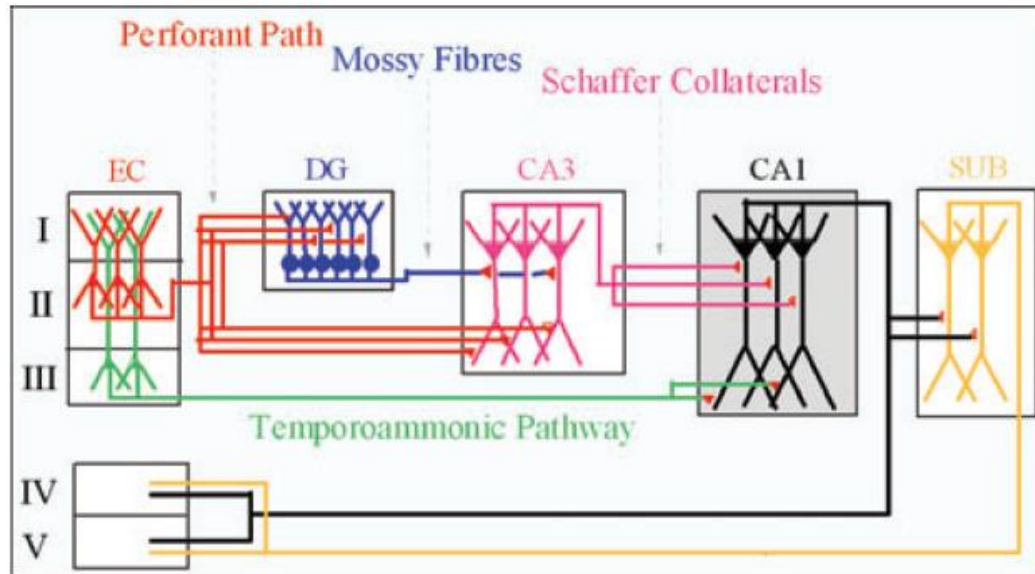


Figura 2. Esquema ilustrativo de las principales conexiones sinápticas de la formación hipocámpica. Tomado de Coulter, *et al.* 2011

3.7 Alzheimer y mecanismos de plasticidad sináptica

La plasticidad sináptica es una propiedad que le permite a una neurona o una población de neuronas responder de manera diferenciada ante un estímulo sináptico, variando significativamente la eficiencia de dicha sinapsis (hecho evidenciado por cambios en la pendiente de subida, la amplitud y la duración de dicha respuesta). Dependiendo de la duración del efecto en el tiempo, la plasticidad sináptica puede ocurrir de dos maneras: 1) *plasticidad a largo plazo*; cuando el efecto es perdurable en el tiempo (>30 minutos); y 2) *plasticidad a corto plazo*; cuando el efecto solo dura menos de 30 minutos.

3.7.1 Plasticidad sináptica a corto plazo

Plasticidad sináptica a corto plazo puede ser regulada por una variedad de procesos que conllevan a la disminución o al aumento de la fuerza sináptica. Una de las maneras más comunes para evaluar los procesos de plasticidad sináptica a corto plazo es por el protocolo de pulsos emparejados (PP del inglés *paired pulses*). Este protocolo sirve para determinar el cambio que sufre una respuesta debido a la previa estimulada eléctrica. El protocolo consiste en dar dos pulsos eléctricos separados por un intervalo entre ellos, y consecuentemente medir la respuesta

neuronal que estas estimulaciones causan. El protocolo de pulsos emparejados muestra dos comportamientos distintivos: 1) La facilitación por pulsos emparejados, cuando la respuesta al segundo estímulo es más grande que la respuesta al primer estímulo; y 2) la desfacilitación por pulsos emparejados, cuando la respuesta al segundo estímulo se encuentra disminuida o inhibida con respecto al primero (Purves *et al.*, 2004)

3.7.1.1 Mecanismos moleculares de la facilitación

Se han propuesto muchos mecanismos moleculares para la facilitación, todos ellos relacionados con el aumento del número de sitios capaces de liberar vesículas y con el aumento de la probabilidad de liberación de vesículas (Zucker & Regehr, 2002). Entre los mecanismos más relevantes para los procesos de facilitación se encuentran: 1) *El mecanismo del Calcio residual*. En este mecanismo se observa una acumulación y una persistencia del calcio en el terminal presináptico después de realizada una activación. Entonces a la llegada de otro estímulo, se liberará mucho más neurotransmisor que antes, pues todavía queda un poco de calcio que resultó debido a la respuesta a un estímulo anterior. 2) *Saturación de los Buffers endógenos de Calcio*. Este mecanismo involucra a las proteínas que se unen al calcio dentro del terminal presináptico. Cuando un primer estímulo es transmitido a la neurona presináptica, el calcio que entra a la neurona ocupa algunas de las proteínas de unión al calcio; luego, al segundo estímulo, habrá menos proteínas para que se unan al calcio, y por lo tanto la cantidad de calcio en el interior de la neurona probablemente se incrementará, lo que produce más liberación de neurotransmisor.

3.7.1.2 Mecanismos moleculares de la desfacilitación

Los mecanismos moleculares propuestos para la desfacilitación o inhibición se han centrado en la disminución de los sitios capaces de liberar vesículas y en la disminución de la probabilidad de liberación (Diasynou & Wade, 2011). Se han propuesto 3 mecanismos generales para explicar la desfacilitación o inhibición: 1) *Depleción de las vesículas*. Existen cientos de vesículas que se encuentran asociadas a una zona activa de liberación, pero aproximadamente un 5% de estas

se pueden liberar con estimulación repetitiva, estas vesículas se conocen como el pool de vesículas listo para ser liberado (RRP del Inglés *readly releasable pool*). Entonces si un primer estímulo libera un gran número de estas vesículas RRP, un estímulo subsecuente producido en un momento en el cual no se permita el re-ensamblaje ni el llenado del RRP, liberará menos vesículas; por tanto habrá una menor liberación de neurotransmisor. 2) *Inactivación de los sitios de liberación*. La fusión de vesículas a los sitios de liberación puede inhibir subsecuentes eventos de fusión. Las vesículas necesitan de proteínas para que se puedan fusionar a la membrana celular. Debido a que la célula recicla las vesículas que ya han sido liberadas, entonces, ante un estímulo presentado en un rango de tiempo menor al necesario para que las proteínas que se desplazaban en la vesícula vuelvan al espacio citoplasmático, se producirá una disminución en la cantidad de vesículas que se liberan y en la cantidad de neurotransmisor liberado. 3) *Reducción en el influjo de calcio*. La liberación de las vesículas depende de la cantidad de calcio dentro del botón presináptico. Por tanto, cambios en el calcio intracelular conllevaría a un cambio en la liberación de neurotransmisor. Algunas proteínas sensibles al calcio como la proteína de unión al calcio 1 (CaBP1), y el sensor de calcio neuronal 1 (NCS-1), interactúan con los canales de calcio y modulan bidireccionalmente su función, lo que conlleva a una regulación de la cantidad de calcio dentro de la neurona

3.7.2 Plasticidad sináptica a largo plazo

La plasticidad sináptica a largo plazo es una propiedad fundamental del sistema nervioso y es considerada como un mecanismo fundamental para los procesos de aprendizaje y memoria (Kandel, 2001). Se caracteriza principalmente por presentar un cambio duradero y dependiente de actividad en la eficiencia sináptica. La plasticidad a largo plazo puede modificar la fuerza sináptica bidireccionalmente: ya sea aumentándola, proceso conocido como potenciación a largo plazo (LTP del inglés *long term-potentiation*), o reduciéndola, proceso conocido como depresión a largo plazo (LTD del inglés *Long term-depression*)(Yang & Calakos, 2013). Aunque no es del todo claro, se ha propuesto que los mecanismos para modificar dicha

fuerza sináptica están muy involucrados con los niveles y el incremento de calcio intracelular, por ejemplo, grandes incrementos de calcio son requeridos para la LTP, mientras que bajos incrementos son importantes para procesos como la LTD. Estas modificaciones en los niveles de calcio, tienen consecuencias tanto a nivel presináptico como a nivel postsináptico. Entre las postsinápticas, la más aceptada es la que involucra los cambios tanto en las propiedades como en el número de receptores AMPA y NMDA, mientras que las modificaciones a nivel presináptico se centran en el incremento o la disminución en la liberación del neurotransmisor (Kandel, 2001; Padamsey & Emptage, 2011).

3.7.3 Efecto del β -amiloide sobre la plasticidad sináptica

Muchas investigaciones han examinado el efecto del péptido β -amiloide sobre los procesos de plasticidad sináptica en el largo plazo. En estos estudios no es claro el efecto que presenta el β -amiloide ya que la mayoría de ellos consideran que el péptido causa daños en la plasticidad sináptica, mientras que otros estudios muestran lo contrario (Cirrito, Kang, Lee, & Stewart, 2008). Sin embargo, en algunos estudios se concluye que el β -amiloide podría funcionar de una manera que depende de la concentración, donde altas concentraciones resultan ser sinaptotóxicas, y bajas concentraciones presentan una función fisiológica que regula la plasticidad sináptica e incluso aumenta la LTP hipocámpica y la formación de la memoria (Garcia-Osta & Alberini, 2009; Palop & Mucke, 2010).

Resulta muy importante resaltar que una característica típica en la EA es la gran acumulación de $A\beta$, por tanto es relevante evaluar los procesos de plasticidad sináptica en estas condiciones. Existe evidencia que muestra que los oligómeros de $A\beta$ son más potentes que las fibrillas o depósitos de $A\beta$ en cuanto a causar anomalías en la función sináptica y la actividad neural. Estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que los oligómeros de $A\beta$ reducen la fuerza y la plasticidad de la transmisión sináptica glutamatérgica. Elevados niveles de $A\beta$ decrementan la transmisión sináptica excitadora debido a la disminución del número de receptores AMPA y receptores NMDA (Palop & Mucke, 2010). Se ha observado que en ensayos *in vitro*, la LTP se bloquea cuando se usan concentraciones altas de $A\beta$

corroborando estos resultados cuando se usan ratones transgénicos que presentan altos niveles de A β (Ma & Klann, 2012). Por otro lado se ha encontrado que fragmentos de A β inyectados en el hipocampo de ratones pueden facilitar el proceso de LTD inducido por la estimulación a baja frecuencia (Kim, Anwyl, Suh, Djamgoz, & Rowan, 2001).

4. Materiales y métodos

4.1 Sujetos experimentales

Todos los procedimientos realizados a los animales, al igual que las condiciones de alojamiento y la disposición de los residuos biológicos y químicos, durante este estudio fueron aprobados por el comité de ética de la facultad de ciencias de la Universidad Nacional de Colombia, y fueron realizados observando las normativas nacionales e internacionales pertinentes: el Título V de la resolución n° 008430 de 1993 del Ministerio de Salud y Ley 84 del 27 de diciembre de 1989; al igual que los procedimientos para el manejo y cuidado de animales de laboratorio recomendados por la normativa de la Unión Europea (8616091EU) y los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos de América (National Research Council, 1996).

Se usaron ocho ratones 3xTg-EA y ocho ratones silvestres de la cepa C57BL/6, con unas edades entre los 15 y 18 meses, y un peso entre los 25 y 30 g. La colonia de animales triple transgénicos para la enfermedad de Alzheimer (3xTg-EA), provino de *The Institute for Brain Aging and Dementia, Center for the Neurobiology of Learning and Memory*, cuyo Co-Director es el Dr. Frank Laferla. Actualmente la colonia de 3xTG-EA se cría de manera endogámica, y se expande para experimentación en condiciones microbiológicamente controladas en el bioterio de la Sede de Investigación Universitaria (SIU) de la Universidad de Antioquia. Los animales que fueron enviados por el Grupo de Neurociencias de la Universidad de Antioquia, se mantuvieron en el bioterio del Instituto de Genética de la Universidad Nacional de Colombia en un microaislador, en cajas-hogar con agua y alimento *ad libitum*, y ciclo de luz/oscuridad de 12 horas, cuyas luces se encendían a las 7:00 a.m.

4.2 Diseño experimental

El diseño experimental de tipo factorial, contempló la interacción de dos factores: 1) el genotipo, y 2) el tratamiento farmacológico. Ocho de los animales fueron de tipo silvestre (*Wild Type*), y los otros ocho restantes fueron triple-transgénicos para la enfermedad de Alzheimer (3xTG-EA). La mitad de los sujetos, de cada uno de estos genotipos, recibieron bexaroteno (BXT), y la otra mitad recibió vehículo (Veh). Así, se conformaron cuatro grupos experimentales:

- Grupo control, conformado por ratones *wild type* tratados con vehículo por 28 días (WT-Veh, n = 4). En estos animales se determinó las propiedades sinápticas basales, y la plasticidad de la proyección comisural CA3→CA1 de sujetos de 15 a 18 meses de edad.
- Grupo *wild-type* + bexaroteno, conformado por ratones *wild type* tratados con el fármaco por 28 días (WT-BXT, n = 4). En estos animales se determinó el efecto del bexaroteno sobre las propiedades sinápticas basales, y la plasticidad de la proyección comisural CA3→CA1 de sujetos de 15 a 18 meses de edad.
- Grupo triple-transgénicos + vehículo, conformado por ratones triple-transgénicos 3xTg-EA tratados con vehículo por 28 días (TG-Veh, n = 4). En estos animales se determinó el efecto del genotipo 3xTg-EA sobre las propiedades sinápticas basales, y la plasticidad de la proyección comisural CA3→CA1 de sujetos de 15 a 18 meses de edad.
- Grupo triple-transgénicos + bexaroteno, conformado por ratones triple-transgénicos 3xTg-EA tratados con BXT por 28 días (TG-BXT, n = 4). En estos animales se determinó la interacción entre el bexaroteno y el genotipo 3xTg-EA sobre las propiedades sinápticas basales y la plasticidad de la proyección comisural CA3→CA1 de sujetos de 15 a 18 meses de edad.

Tabla 1. Diseño experimental factorial

Tratamiento \ Genotipo	Wild Type	3xTG-EA
Vehículo	WT-Veh (n = 4)	TG-Veh (n = 4)
Bexaroteno	WT-BXT (n = 4)	TG-BXT (n = 4)

4.3 Preparación y administración del fármaco

Para la preparación del fármaco se tuvo en cuenta los componentes principales que posee la formulación comercial del bexaroteno (Targretina®). El bexaroteno se preparó diariamente en tubos Eppendorf de 2.0 ml suspendiendo 20 mg de bexaroteno en 1.2 ml de vehículo. El vehículo se preparó mezclando polietilenglicol-400 (PEG-400, 5 ml), Tween 20 (0.25 ml) y agua (44.75 ml), con lo cual se asegura la correcta y exacta suspensión del bexaroteno. Para la homogenización de la suspensión de bexaroteno se usó un sonicador.

Finalmente, por medio de una jeringa y una sonda curva calibre 22, se suministró oralmente a cada uno de los animales 200 μ L de vehículo solamente, o bexaroteno suspendido en el vehículo, de acuerdo al grupo al que pertenecía el animal. Esta dosis se suministró a cada animal diariamente entre las 9.00 am y las 10.00 am durante 28 días. El día 29, después de la iniciación del tratamiento, se procedió a realizar los registros electrofisiológicos.

4.4 Procedimiento quirúrgico

Para todos los procedimientos quirúrgicos, los ratones fueron anestesiados con uretano al 25% (1,5 g/kg), mezclado con xilacina al 2% (10 mg/Kg). Una vez alcanzado el nivel de anestesia adecuado, se procedió a afeitar la parte dorsal de la cabeza del animal, para luego montarla en un marco estereotáxico. Se expuso el cráneo a través de una incisión fronto-occipital con bisturí. El periostio se removió exhaustivamente, y si era necesario debido a los puntos sangrantes, se realizaba hemostasia con cera quirúrgica. Se identificaron los puntos Bregma (intersección

de la sutura coronal y la sutura sagital), y Lambda (intersección de la sutura sagital y la sutura occipital), y se verificó que estos dos puntos se encontraran a la misma profundidad, con esto se aseguraba la nivelación del cráneo en sentido rostro-caudal.

Se ubicaron y marcaron las coordenadas de inserción de los electrodos con respecto a Bregma (CA1: AnteroPosterior (AP) = -2,0 mm; Lateral (L)= 1,5 mm; Profundidad (P) = 1,5 mm; CA3 (contralateral): AP = -2,0mm, L = 2,0 mm, P=2,0 mm). En los sitios marcados se perforó un agujero en el cráneo hasta exponer la duramadre, que se retiró con una aguja hipodérmica modificada para tal fin (doble en cuello de cisne y punta curvada). Mediante micromanipuladores se insertaron los electrodos de estimulación (dirigido a la región CA3 del hipocampo de lado derecho, hasta una profundidad máxima de 2,0 mm), y de registro (dirigido a CA1, hasta una profundidad máxima de 1,5 mm). El emplazamiento final de los electrodos se ajustó de acuerdo a los registros electrofisiológicos. Durante todo el procedimiento quirúrgico y el registro electrofisiológico, se aplicaron dosis suplementarias de la anestesia para mantener un nivel anestésico profundo (Figura 3).

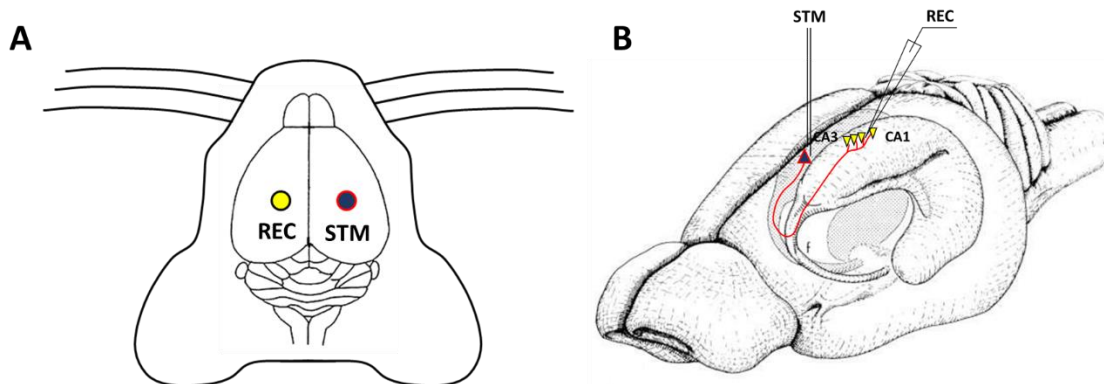


Figura 3. Esquema representativo de la preparación experimental usada en la investigación. Se muestra los lugares de estimulación (STM) y de registro (REC) en el cerebro del ratón. **A)** Vista dorsal los puntos de inserción de los electrodos. **B)** Representación tridimensional en $\frac{3}{4}$ de perfil en la que por transparencia se ven los hipocampos de cada hemisferio con los emplazamientos finales de los electrodos de registro y estimulación.

4.5 Electroodos

Electrodos de estimulación. La estimulación de la región CA3 del hipocampo derecho, se realizó con electrodos bipolares concéntricos confeccionados con agujas de odontología (27 G) y alambre de bobina (cobre recubierto con laca).

Electrodos de registro. Los registros extracelulares en la región CA1 se realizaron con microelectrodos de Tungsteno (0,005") con una resistencia en la punta de 5MΩ.

4.6 Estimulación

Se administraron pulsos rectangulares de 100 μs de duración, a través de una unidad de aislamiento de estímulos modelo Isolator -11 (Axon Instruments), que a su vez se controló por un generador de pulsos modelo 9514 (Quantum Composers). Para la generación de la curva input/output (I/O) se administraron pulsos únicos con una frecuencia de 0,33 Hz y con una intensidad variable (100 - 400 μA, con pasos de 50 μA). La intensidad con la que se obtuvo el 50% de la respuesta máxima (I50), se utilizó para la estimulación basal, el protocolo de pulsos emparejados y la inducción de LTP.

Para evaluar la plasticidad sináptica a corto plazo se utilizó un protocolo de pulsos emparejados. Este consistió en dar dos pulsos cuadrados, con una intensidad igual a I50, separados cada uno con un Intervalos (Intervalo Entre Estímulos IEE). Los intervalos evaluados fueron: 50 ms, 75 ms, 100 ms, 200 ms, 300 ms y 500 ms.

Para evaluar la plasticidad sináptica a largo plazo, se estableció la respuesta para la línea de base, en la cual, durante 10 minutos, se administró un pulso con intensidad I50 y con una frecuencia de 0,033 Hz. Para la inducción de la plasticidad a largo plazo se utilizó un protocolo de estimulación a alta frecuencia (HFS del inglés *High Frequency Stimulation*), el cual consistió en dar seis trenes compuestos de 100 pulsos a 100 Hz, separados por un intervalo de 60 segundos. Inmediatamente después del protocolo de inducción, se regresó al protocolo de estimulación de la línea de base durante 60 minutos. Al final del experimento se realizó una nueva curva I/O.

4.7 Registro en la región CA1 del hipocampo

La señal electrofisiológica obtenida con el electrodo de registro, se amplificó 100 veces con un preamplificador NEX-1 acoplado en Corriente Alterna (AC del inglés Alternating Current). Posteriormente con un acondicionador de señales CyberAmp 380 (Axon Instruments) acoplado en AC, la señal se filtró (0,1 Hz a 10 kHz), y se amplificó 20 veces más, obteniendo una magnificación total de 2.000 veces. La señal obtenida se digitalizó con una frecuencia de muestreo de 10 kHz, mediante un convertidor análogo digital DigiData 1200 (Axon Instruments). Los registros se almacenaron en medio magnético para ser analizados *off-line*.

4.8 Verificación histológica del emplazamiento de los electrodos

Una vez terminados los registros electrofisiológicos, se procedió a retirar el cerebro de los animales con el fin de comprobar la ubicación final de los electrodos. Para ello el animal fue decapitado, aún en estado de anestesia profunda. Se retiró rápida y cuidadosamente la capa ósea del cráneo y las meninges, de forma que se liberó el cerebro. El cerebro se almacenó en viales con paraformaldehído (PFA) para asegurar su conservación. Finalmente con el uso de un vibrátomo (Vibratome 1000 plus), se realizaron cortes coronales de 100 μm de espesor de la región de interés. Cada corte se examinó en un estereoscópio (Olympus SZX16) y se tomaron fotografías de la ubicación final de los electrodos, con una cámara fotográfica adaptada (Anexo 1) (Sony cybershot DSCW7).

4.9 Procesamiento de datos

Los datos experimentales se analizaron con el programa informático Clampfit (V.8.0). Con este programa se obtuvieron las curvas promedio para cada una de las intensidades evaluadas en los diferentes experimentos, y también, las curvas promedio de las líneas de base, antes y después de la inducción HFS.

Se midió la amplitud pico a pico de la respuesta postsináptica excitadora (PSE) para poder hacer comparaciones cuantitativas entre los grupos experimentales. La amplitud de la respuesta PSE permitió obtener datos cuantitativos para evaluar: a)

el cambio de la amplitud de la respuesta PSE con respecto a la intensidad de estimulación; b) la razón entre la amplitud de la respuesta al segundo pulso y la amplitud de la respuesta al primero para los pulsos emparejados y; c) los promedios por minuto de la amplitud de la respuesta pre y post inducción HFS. Con estos datos se construyeron las gráficas de dispersión para evaluar la respuesta sináptica basal (relación I/O); las gráficas de dispersión para evaluar los procesos de facilitación o desfacilitación por pulsos emparejados; y las gráficas de dispersión del cambio relativo de la respuesta con respecto al tiempo antes y después de la inducción HFS.

La normalización de los datos fue indispensable para poderlos agrupar y posteriormente poder analizar el comportamiento de estos datos en los diferentes grupos experimentales. Para el análisis de la actividad sináptica basal (relación I/O), la respuesta PSE encontrada con la estimulación más baja (estimulación umbral), se utilizó para normalizar las respuestas PSE encontradas al ir aumentando la estimulación en cada uno de los animales pertenecientes a un grupo experimental específico. De esta forma se logró representar el cambio de la respuesta PSE como un cambio en la respuesta PSE umbral. Con estos datos se construyeron graficas de dispersión para la amplitud de la respuesta PSE y la intensidad de estimulación. Se encontraron las ecuaciones que mejor se ajustaron a la distribución de los datos promedio, y finalmente se encontró la pendiente máxima de esta función.

Para el análisis de la plasticidad sináptica a corto plazo se calculó la amplitud pico a pico de la respuesta PSE para los dos pulsos. Posteriormente se realizó el cociente entre la amplitud de la respuesta PSE al segundo pulso y la amplitud de la repuesta PSE al primer estímulo (R_2/R_1). Posteriormente, se promediaron los cocientes R_2/R_1 de cada uno de los animales de un grupo experimental específico. Con los cocientes R_2/R_1 promediados se construyeron graficas de dispersión para cada grupo experimental. Además se calculó el área bajo la curva descrita por las variables IEE vs. Cociente R_2/R_1 y se analizó las diferencias entre los grupos experimentales.

Para el análisis de la plasticidad a largo plazo se calculó la amplitud pico a pico de la respuesta PSE durante la línea de base y después del protocolo de inducción de LTP. Estos datos fueron promediados de modo que se obtuvieron valores por cada minuto. Con estos promedios por minuto se encontró un promedio general de la respuesta PSE durante los 10 minutos que duró la línea de base. Posteriormente, todos los datos por minuto fueron normalizados de manera que mostraran el porcentaje de cambio que tenía cada uno con respecto al promedio general durante la línea de base. Con los datos se construyeron graficas de dispersión mostrando el porcentaje de cambio de la respuesta PSE y el tiempo en minutos.

4.10 Análisis estadístico

Se usaron pruebas estadísticas para comparar las respuestas entre los grupos experimentales utilizando análisis de varianza (ANOVA) de una y de dos vías; y como pruebas *post hoc* se utilizó el método de Holm-Sidak.

5. Resultados

La edad de los sujetos al comienzo del estudio fue de 15 ± 1 meses y su peso promedio fue $26,3 \pm 3,4$ g, y no hubo diferencias significativas entre los animales *wild type* y los animales triple transgénicos para la enfermedad de Alzheimer (3xTG-EA) ($F_{(1, 18)} = 1,912$, $p = 0,187$). Mediante ANOVA de dos vías se determinó que el genotipo (WT vs. TG) no tuvo efectos significativos sobre el peso al final del período de 28 días de tratamiento ($F_{(1, 18)} = 1,744$; $p = 0,206$). Sin embargo, hubo un efecto significativo del tratamiento (VEH vs. BXT, $F_{(1, 18)} = 6,930$, $p = 0,019$), pero no hubo una interacción significativa entre el genotipo y el tratamiento ($F_{(1, 18)} = 3,426$, $p = 0,084$). El análisis *post hoc* indicó que los animales tratados con bexaroteno tuvieron un peso significativamente mayor que los sujetos tratados con vehículo (VEH: $27,55 \pm 1,04$ g vs. BXT: $31,32 \pm 0,98$ g; $t = 2,632$; $p = 0,019$), pero no hubo diferencia significativa de peso entre los sujetos *wild-type* y transgénicos (WT: $30,38 \pm 0,98$ g vs. TG: $28,49 \pm 1,04$ g; $t = 1,321$, $p = 0,206$).

5.1 Respuesta postsináptica en CA1 provocada por estimulación de CA3 contralateral

Al suministrar pulsos eléctricos cuadrados en la región CA3 del hipocampo de los ratones se produce una respuesta postsináptica excitadora (PSE) extracelular en la región CA1 del hipocampo contralateral. Esta respuesta PSE tiene una latencia aproximada de 15 ms y, dependiendo de la profundidad del electrodo de registro, puede presentarse como una deflexión de voltaje positiva o negativa (Figura 4). Esta diferencia en el sentido de la deflexión del potencial extracelular se debe al carácter de campo abierto del hipocampo, que es consecuencia de la distribución homogénea de las células piramidales en la región CA1. El soma de las neuronas piramidales está ubicado en una sola capa (*stratum pyramidale*); las dendritas

apicales de estas neuronas están orientadas hacia la parte más ventral de la región, formando el *stratum radiatum*; y los axones y las dendritas basales, se orientan hacia la parte dorsal de la región formando el *stratum oriens*. Las sinapsis de CA3 sobre CA1 se distribuyen fundamentalmente en el *stratum radiatum*, por lo que cuando la punta del electrodo se encuentra más cerca de esta capa registra la respuesta PSE como un movimiento de cargas que se aleja del electrodo (deflexión negativa, sumideros de corriente) (Figura 4B). En contraste, cuando la punta se encuentra cerca del *stratum oriens*, registra la respuesta PSE como un movimiento de cargas que se acercan al electrodo (deflexión positiva, fuentes de corriente) (Figura 4B).

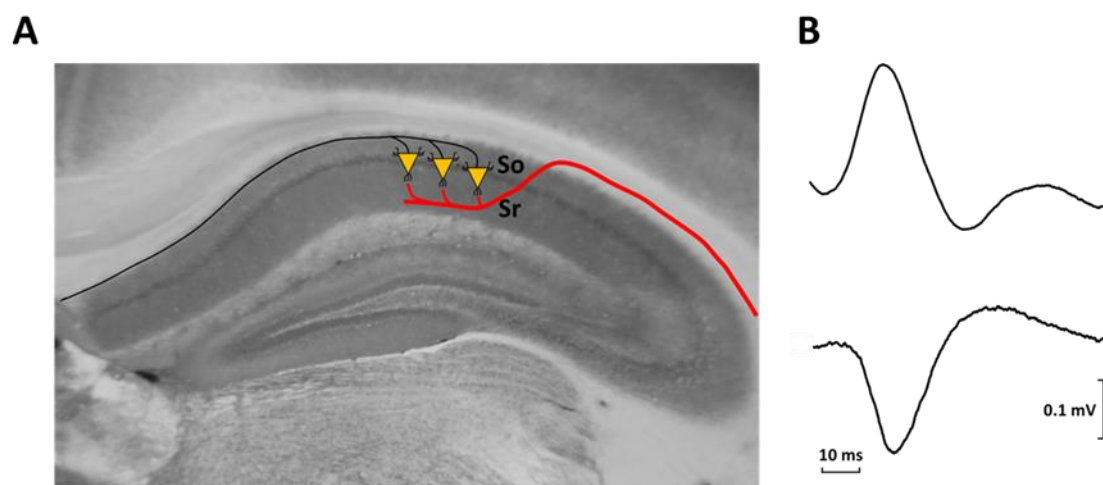


Figura 4. Registro extracelular de las respuesta postsináptica excitadora (PSE) en la sinapsis comisural CA3→CA1 y su variación en función del emplazamiento relativo del electrodo de registro. **A)** Esquema representativo de las sinapsis comisural CA3→CA1 superpuesto en una microfotografía de un corte coronal de la formación hipocámpica. Abreviaturas: Sr, *stratum radiatum*; y So, *stratum oriens*. **B)** Trazos representativos de la forma de onda de respuesta PSE extracelular registrada en en el *stratum oriens* (arriba) y en el *stratum radiatum* (abajo).

La sinapsis CA3→CA1 de los animales control (WT-Veh) se activó con un umbral de $100 \pm 50 \mu\text{A}$ y su respuesta alcanzó la saturación con una intensidad de $350 \pm 50 \mu\text{A}$ (Figura 5). La ecuación que se ajustó mejor a los datos promedio de la relación I/O de estos animales fue:

$$A_{PSE} = 6,16\text{Ln}(i_{ST}) - 27,88$$

Donde A_{PSE} = amplitud pico a pico de la PSE expresada en mV, i_{ST} = intensidad del estímulo (expresada en μA). Esta ecuación tuvo un coeficiente de determinación $r^2 = 0.97$, y la pendiente máxima de la función que describe fue de $23,8 \pm 9,0$ mV/mA (Figura 5A y B).

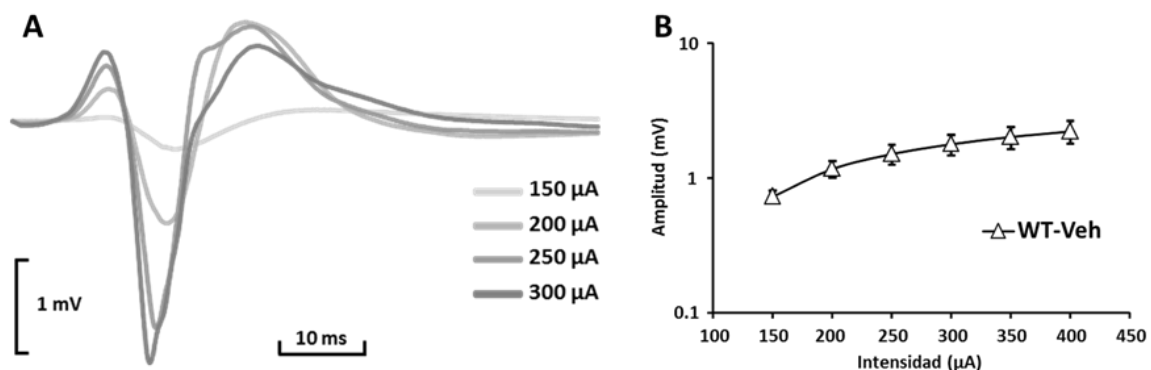


Figura 5. La intensidad del estímulo modificó la respuesta PSE en la sinapsis comisural CA3→CA1 en el hipocampo de ratones control (*Wild-type* tratados con vehículo, WT-Veh). **A)** Superposición de trazos que ilustra el cambio de la amplitud de la respuesta PSE frente a diferentes intensidades de estimulación (la escala de grises indica la intensidad del estímulo aplicado) en un animal representativo del grupo control. **B)** Variación de la amplitud de la deflexión negativa de la respuesta PSE en función de la intensidad del estímulo aplicado (curva de entrada por salida, I/O) en los animales control.

Aunque la respuesta PSE fue semejante en su forma en todos los grupos experimentales y fue directamente proporcional a la intensidad de estimulación, la comparación de la pendiente máxima de las curvas de regresión de los grupos experimentales mediante ANOVA de una vía, evidenció la presencia de diferencias significativas ($F_{(3, 159)} = 13,142$, $p < 0,001$) (Figura 6A).

La ecuación que se ajusta mejor a los datos promedio de la relación I/O de los animales *wild type* tratados durante 28 días con bexaroteno (WT-BXT) es:

$$A_{PSE} = 2,60 \ln(i_{ST}) - 10,43$$

El coeficiente de determinación de esta ecuación fue $r^2 = 0,87$. La pendiente máxima de esta función fue significativamente menor que la de los animales WT-Veh ($10 \pm 9,0$ mV/mA, $t = 3,508$, $p < 0.001$) (Figura 6B y C).

La ecuación que se ajusta mejor a los datos promedio de la relación I/O de los animales triple transgénicos para la enfermedad de Alzheimer (3xTG-EA) tratados por 28 días con la solución vehículo (TG-Veh) fue:

$$A_{PSE} = 1,68Ln(i_{ST}) - 6,68$$

El coeficiente de determinación de esta ecuación fue $r^2 = 0,92$. La pendiente máxima de esta función fue significativamente menor que la de los animales WT Veh ($6,5 \pm 4,3$ mV/mA, $t = 4,417$, $p < 0.001$) (Figura 6B y C).

Finalmente, la ecuación que se ajusta mejor a los datos promedio de la relación I/O de los animales 3xTG-EA tratados durante 28 días con bexaroteno (TG-BXT) fue:

$$A_{PSE} = 6,95Ln(i_{ST}) - 31,82$$

El coeficiente de determinación de esta ecuación fue $r^2 = 0,95$. La pendiente máxima de esta función ($26,9 \pm 32,4$ mV/mA) fue significativamente mayor que la de los animales TG Veh ($t = 5,207$, $p < 0.001$), pero no fue significativamente distinta de la de los animales WT Veh ($t = 0,790$, $p = 0,431$) (Figura 6B y C).

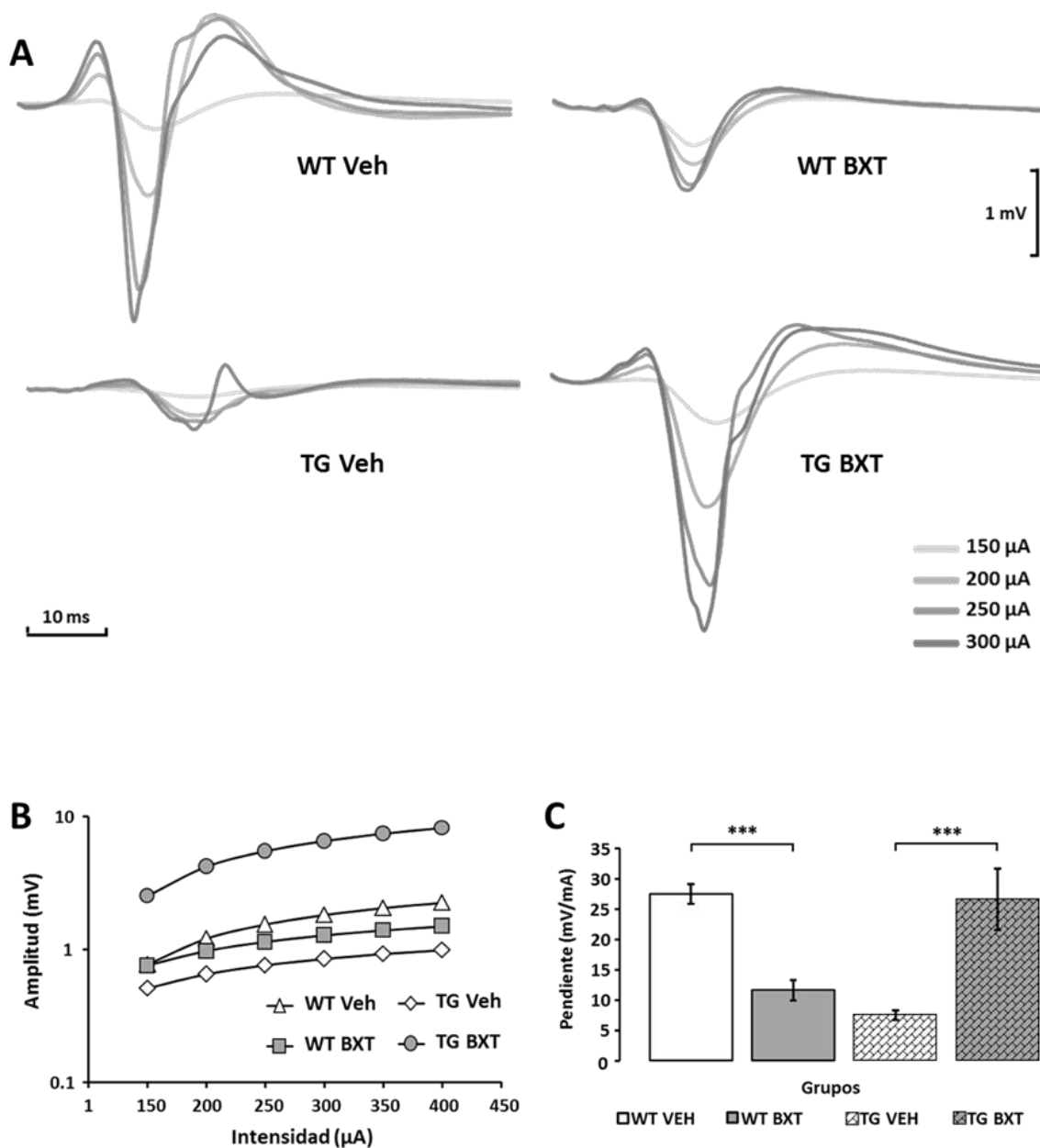


Figura 6. El fenotipo y el tratamiento farmacológico modificaron la transmisión sináptica basal en la sinapsis comisural CA3→CA1 en el hipocampo. **A)** Superposición de trazos que ilustra el cambio de la amplitud de la respuesta PSE frente a diferentes intensidades de estimulación (la escala de grises indica la intensidad del estímulo aplicado) en individuos representativos de cada uno de los grupos experimentales. **B)** Curvas I/O de la amplitud de la respuesta PSE para cada uno de los grupos experimentales. **C)** Pendientes máximas de la curva I/O para cada uno de los grupos experimentales. Se representa la media \pm el error estándar. Abreviaturas: ***, diferencias significativas entre grupos, $p < 0.001$.

5.2 Plasticidad por pulsos emparejados

Al analizar la plasticidad sináptica a corto plazo en la sinapsis CA3→CA1, se encontró facilitación por estimulación por pulsos emparejados en CA3 del hemisferio contralateral. Esta plasticidad fue evaluada usando la intensidad de estímulo necesaria para provocar una respuesta de amplitud igual al 50% de la respuesta máxima (I_{50} , media global = $200 \pm 50 \mu\text{A}$).

La respuesta PSE de los animales WT-Veh ante el segundo pulso fue significativamente diferente que aquella ante el primero ($F_{(6, 209)} = 6,803$, $p < 0.001$) (Figura 7A). El análisis *post hoc* reveló que para los intervalos en el rango de 50 a 300 ms la respuesta ante el segundo pulso fue significativamente mayor que ante el primero (IEE = 50 ms, $t = 5,153$, $p < 0,001$; IEE = 75 ms, $t = 4,404$, $p < 0,001$; IEE = 100 ms, $t = 4,702$, $p < 0,001$; IEE = 200 ms, $t = 3,465$, $p < 0,001$; IEE = 300, $t = 3,074$, $p < 0,001$). Con el intervalo de 500 ms no se encontraron diferencias significativas entre las respuesta ante el segundo y el primer pulso ($t = 1,600$, $p = 0.111$) (Figura 7B). Esto indica facilitación por pulsos emparejados en la sinapsis CA3→CA1. Para comparar las curvas del cociente R2/R1 como función del IEE entre grupos se utilizó el área bajo la curva (ABC) de las mismas. El ABC del grupo WT-Veh fue de $7,21 \pm 1,16$ ms (Figura 7K).

La respuesta PSE de los animales WT-BXT ante el segundo pulso fue significativamente diferente que aquella ante el primero ($F_{(6, 209)} = 15,359$, $p < 0.001$) (Figura 7C). El análisis *post hoc* reveló que para los intervalos en el rango de 50 a 300 ms hubo facilitación por pulsos emparejados (IEE = 50 ms, $t = 7,712$ $p < 0,001$; IEE = 75 ms, $t = 4,752$, $p < 0,001$; IEE = 100 ms, $t = 5,266$, $p < 0,001$; IEE = 200 ms, $t = 5,448$, $p < 0,001$; IEE = 300 ms, $t = 3,943$, $p < 0,001$). Con el intervalo de 500 ms no se encontraron diferencias significativas en las respuesta ante el segundo y el primer pulso ($t = 0,529$, $p = 0,597$) (Figura 7D).

La respuesta PSE de los animales TG-Veh ante el segundo pulso fue significativamente diferente que aquella ante el primero ($F_{(6, 209)} = 6,465$, $p < 0.001$) (Figura 7E). Al realizar un análisis *post hoc*, se encontró que estos animales solo

presentaron facilitación con el intervalo de 50 ms ($t = 2,888$, $p < 0,01$); sin embargo, no hubo plasticidad significativa por pulsos emparejados con los demás intervalos (IEE = 200 ms, $t = 2,365$, $p = 0,225$; IEE = 300 ms, $t = 2,287$, $p = 0,256$; IEE = 500 ms, $t = 1,142$, $p = 0,255$) (Figura 7F).

Por último, la respuesta PSE de los animales TG-BXT ante el segundo pulso fue significativamente diferente que aquella ante el primero ($F_{(6, 209)} = 5,798$, $p < 0,001$) (Figura 7G). El análisis *post hoc* mostró procesos de facilitación por pulsos emparejados en los intervalos entre 100 y 500 ms (IEE = 100 ms, $t = 3,874$, $p < 0,001$; IEE = 200 ms, $t = 4,459$, $p < 0,001$; IEE = 300 ms, $t = 3,755$, $p < 0,001$; IEE = 500 ms, $t = 2,443$, $p = 0,015$) (Figura 7H).

Al comparar el ABC de las curvas del cociente R2/R1 como función del IEE se encontró una diferencia significativa en el valor del área bajo la curva para cada uno de los grupos experimentales ($F_{(3, 119)} = 17,209$, $p < 0,001$). El análisis *post hoc* mostro que el ABC de los animales WT-BXT ($8,03 \pm 1,60$ ms) fue significativamente mayor que el área bajo la curva de los animales WT-Veh ($t = 2,666$, $p = 0,009$). Por otro lado, el ABC de los animales TG-Veh ($5,87 \pm 0,65$ ms) fue significativamente menor que la presentada por los animales TG-BXT ($6,72 \pm 1,16$, $t = 2,754$, $p = 0,007$) y los animales WT-Veh (Figura 7K). Lo que indica que el BXT mejora la facilitación por pulsos emparejados en animales WT y TG.

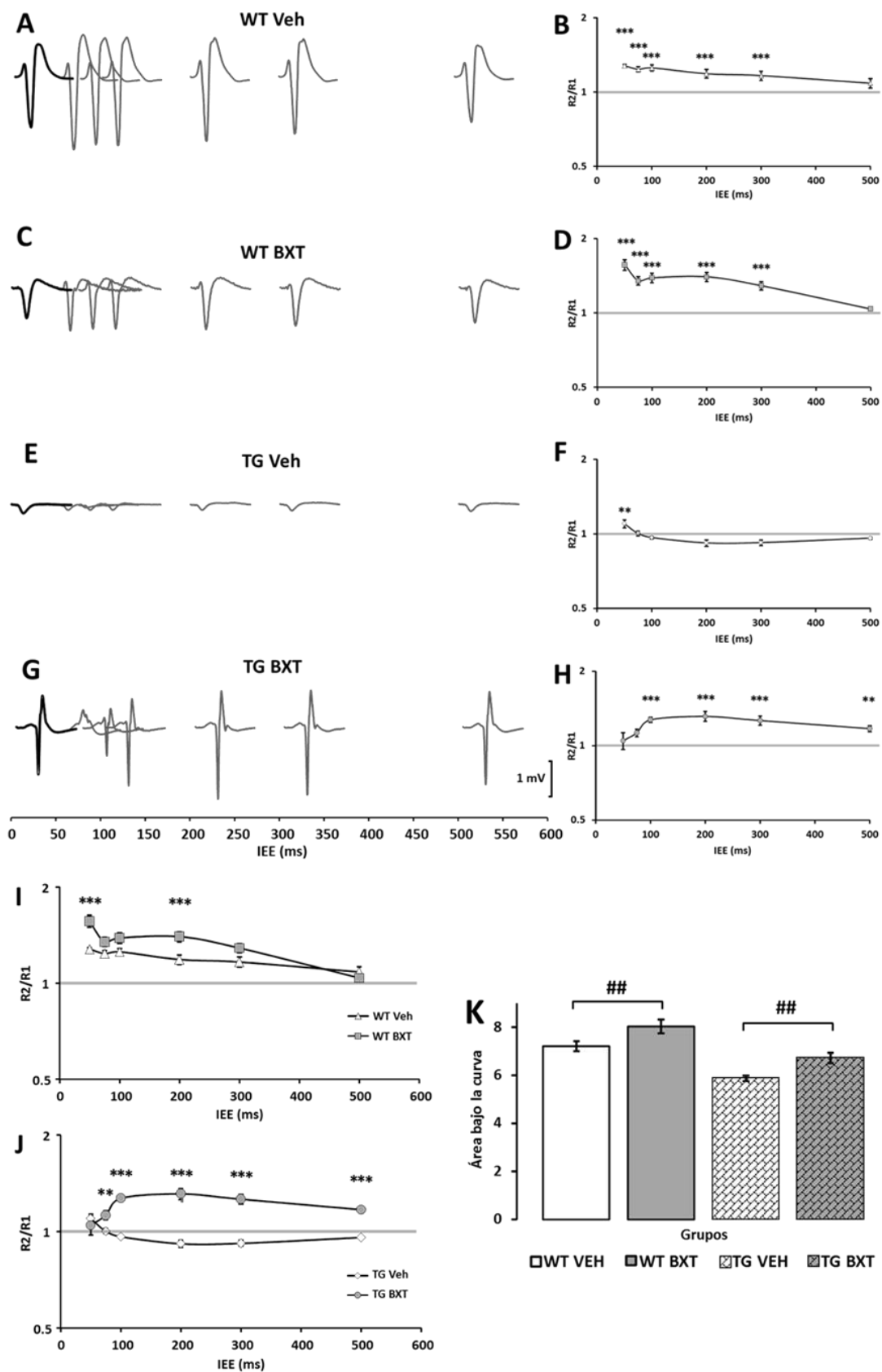


Figura 7 El fenotipo y el tratamiento farmacológico modificaron la plasticidad por pulsos emparejados en la sinapsis comisural CA3→CA1 en el hipocampo. **A), C), E) y G)** Conjuntos de trazos que ilustran el cambio de la respuesta PSE frente al segundo pulso (trazos grises) aplicado tras diferentes intervalos (IEE) después del primer pulso (trazos negros) en individuos representativos de cada uno de los grupos experimentales. **B), D), F) y H)** Graficas de dispersión que ilustran el comportamiento del cociente entre la amplitud de la respuesta al segundo estímulo y la amplitud de la respuesta al primer estímulo (R_2/R_1) como función del IEE para cada uno de los grupos experimentales. **I)** Efecto del tratamiento farmacológico sobre la plasticidad por pulsos emparejados en animales *Wild-type* (bexaroteno, cuadrados grises, vs. vehículo, triángulos blancos). **J)** Efecto del tratamiento farmacológico sobre la plasticidad por pulsos emparejados en animales 3xTG-EA (bexaroteno, círculos grises, vs. vehículo, diamantes blancos). **K)** Área de las curvas de plasticidad por pulsos emparejados para cada uno de los grupos experimentales. Se representa la media \pm el error estándar. Abreviaturas: *******, diferencias significativas entre grupos o diferencias significativas con respecto al cociente R_2/R_1 para el intervalo 500 ms, $p < 0.001$; **##**, diferencias significativas entre grupos, $p < 0.01$.

5.3 Potenciación a largo plazo

Para evaluar la plasticidad sináptica a largo plazo en la sinapsis CA3→CA1, se indujo potenciación a largo plazo (LTP) por estimulación de alta frecuencia (HFS) aplicada en CA3 del hemisferio contralateral. Esta plasticidad fue evaluada usando la intensidad I_{50} (media global = $200 \pm 50 \mu\text{A}$).

5.3.1 Línea de base

La amplitud máxima de la respuesta PSE frente a estímulos con intensidad I_{50} fue significativamente diferente entre grupos ($F(3, 131) = 13,700$, $p < 0,001$). El análisis *post hoc* mostró que la amplitud de la respuesta PSE en los animales WT-Veh ($1,16 \pm 1,0$ mV) fue significativamente mayor que la de los animales WT-BXT ($0,60 \pm 0,24$ mV, $t = 3,080$, $p = 0,002$). Por otro lado, la amplitud máxima de la respuesta PSE de los animales TG-Veh ($0,47 \pm 0,23$ mV) fue significativamente menor que la de los animales TG-BXT ($1,36 \pm 0,88$ mV, $t = 5,621$, $p < 0,001$). Sin embargo, la amplitud máxima de la respuesta PSE de los animales WT-Veh y TG BXT no fue significativamente distinta ($t = 0,561$, $p = 0,576$).

5.3.2 Cambio en la relación I/O

En animales WT-Veh, tras la aplicación de HFS en CA3 contralateral, se observó un desplazamiento significativo hacia la izquierda de la relación I/O de la respuesta PSE (Figura 8A). En efecto, la pendiente máxima de la curva de regresión logarítmica de la relación I/O después de la inducción fue de $29,57 \pm 11,15$ mV/mA,

lo que representa un aumento significativo con respecto al valor obtenido antes de la inducción ($23,8 \pm 9,0$ mV/mA, $t_{(238)} = -4,347$, $p < 0,05$) (Figura 8B). El cociente entre la pendiente máxima de la curva de regresión logarítmica después de la inducción ($M_{d.i.}$) y la pendiente máxima antes de la inducción ($M_{a.i.}$) fue 1.25 ± 0.97 .

En animales WT-BXT, tras la aplicación de HFS en CA3 contralateral, se observó un desplazamiento significativo hacia la derecha de la relación I/O (Figura 8C). En efecto, la pendiente máxima de la curva de regresión logarítmica de la relación I/O después de la inducción fue de $5,21$ mV/mA, lo que representa una disminución significativa con respecto al valor obtenido antes de la inducción ($10,06 \pm 9,0$ mV/mA; $t_{(78)} = 3,405$; $p = 0,001$) (Figura 8D). El cociente $M_{d.i.} / M_{a.i.}$ fue $0,51$.

En animales TG-Veh después de la aplicación de HFS en CA3 contralateral, no se encontró cambio significativo la relación I/O (Figura 8E). Así, la pendiente máxima de la curva de regresión logarítmica de la relación I/O después de la inducción fue de $6,86 \pm 5,75$ mV/mA, que no fue significativamente diferente del valor obtenido antes de la inducción ($6,50 \pm 4,32$ mV/mA; $t_{(478)} = -0,783$; $p = 0,434$) (Figura 8F). El cociente $M_{d.i.} / M_{a.i.}$ fue igual a $1,06 \pm 0,20$.

En animales TG BXT la aplicación de HFS en CA3 contralateral provocó un desplazamiento significativo hacia la izquierda de la relación I/O (Figura 8G). En efecto, la pendiente máxima de la curva de regresión logarítmica de la relación I/O después de la inducción fue de $45,70 \pm 70,58$ mV/mA, lo que representa un aumento significativo con respecto al valor obtenido antes de la inducción ($26,89 \pm 32,37$ mV/mA, $t_{(398)} = -3,431$; $p < 0,001$) (Figura 8H). El cociente $M_{d.i.} / M_{a.i.}$ fue 1.70 ± 0.87 .

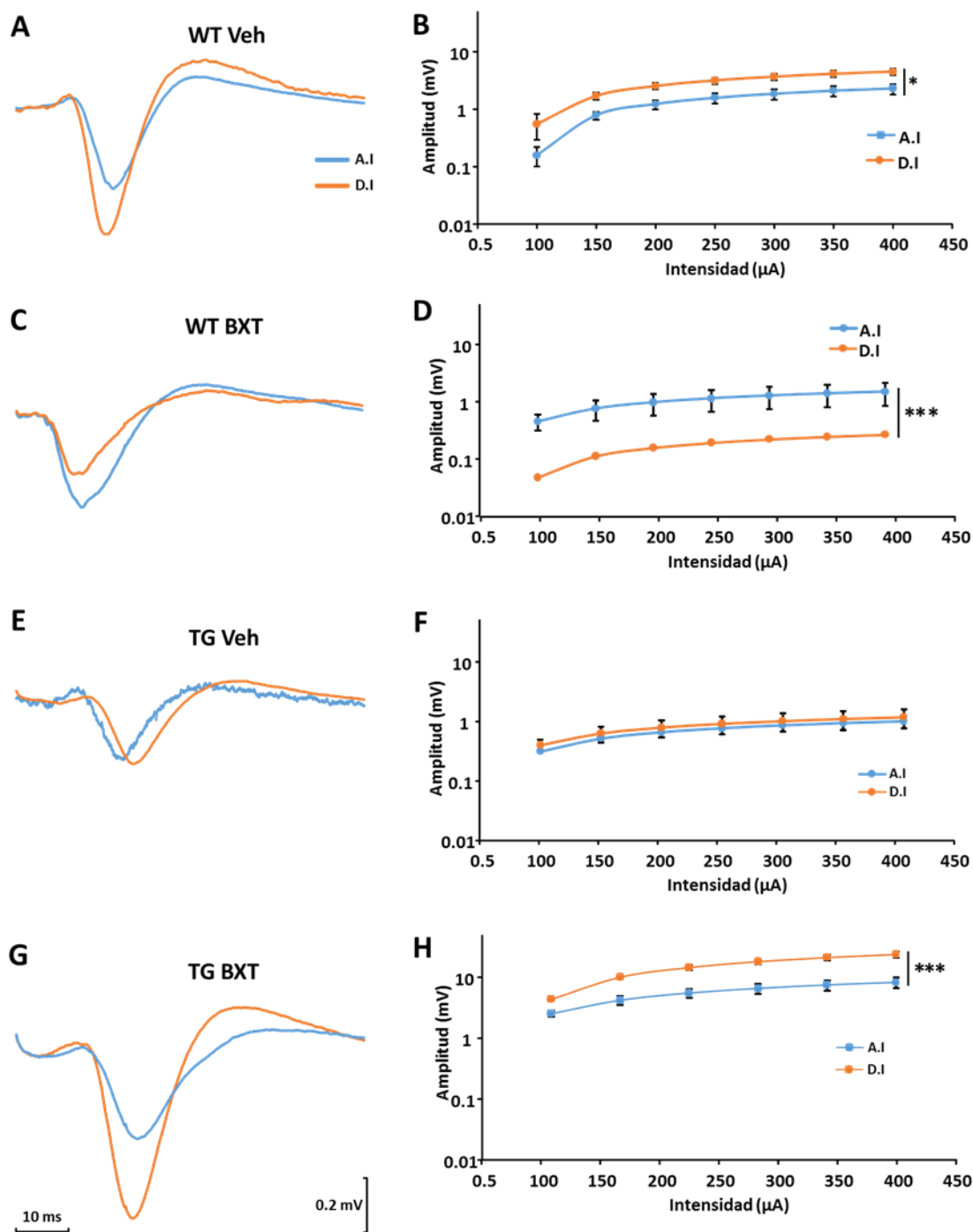


Figura 8. El fenotipo y el tratamiento farmacológico modificaron la potenciación a largo plazo en la sinapsis comisural CA3→CA1 en el hipocampo I: curvas I/O. **A), C), E), G)** Superposición de trazos representativos de la respuesta PSE antes (azul) y después (anaranjado) de la inducción con HFS provenientes de individuos representativos de cada uno de los grupos experimentales. **B), D), F), H)** Comparación de las curvas I/O antes (azul) y después (anaranjado) de la inducción con HFS para cada grupo experimental. Se representa la media \pm el error estándar. Abreviaturas: A.I., antes de la inducción; D.I., después de la inducción; *, diferencias significativas entre curvas antes y después de la inducción con HFS, $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$.

La comparación del cociente $M_{d,i} / M_{a,i}$ entre los grupos experimentales mediante ANOVA de una vía reveló diferencias significativas ($F_{(3, 459)} = 52,745$, $p < 0,001$). El análisis *post hoc* mostró que el cociente $M_{d,i} / M_{a,i}$ de los animales WT-Veh fue significativamente mayor que el de los animales WT-BXT ($t = 6,077$, $p < 0,001$); de igual forma, el cociente $M_{d,i} / M_{a,i}$ de los animales TG-BXT fue significativamente mayor que el de los animales TG-Veh ($t = 9,875$, $p < 0,001$), pero no fue diferente de aquel de los animales WT-Veh (t, p) (Figura 9).

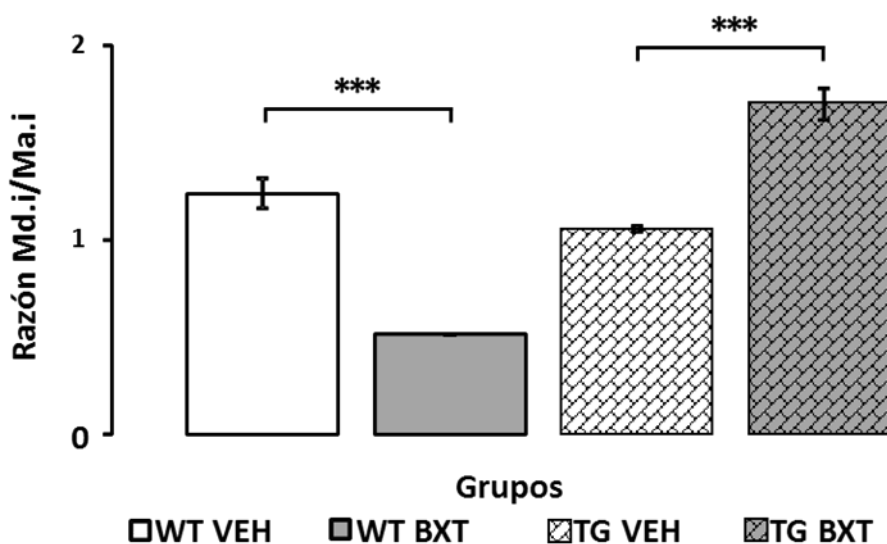


Figura 9. El fenotipo y el tratamiento farmacológico modificaron la potenciación a largo plazo en la sinapsis comisural CA3→CA1 en el hipocampo II: cambio en la pendiente de la curva I/O. El diagrama de barras ilustra el cociente entre la pendiente máxima de las curvas I/O después y antes de la inducción con HFS ($M_{d,i}/M_{a,i}$) para cada uno de los grupos experimentales. Se representa la media \pm el error estándar. Abreviaturas: ***, diferencias significativas entre grupos, $p < 0.001$.

5.3.3 Cambio en la amplitud máxima de la respuesta PSE

En los animales del grupo WT-Veh la HFS indujo un aumento de la amplitud máxima de la respuesta PSE con respecto a la línea de base que se mantuvo durante al menos 60 min ($F_{(6, 209)} = 9,613$, $p < 0,001$) (Figura 10A). El análisis *post hoc* mostró un aumento significativo en la amplitud máxima relativa (porcentaje de la línea de base) de la respuesta PSE 10 min ($126,77 \pm 23,93$ %, $t = 3,681$, $p <$

0,001) y 50 min ($143,70 \pm 30,35$ %, $t = 6,014$, $p < 0,001$) después de la HFS (Figura 10B y 10C).

En los animales WT-BXT la HFS no indujo LTP, puesto que la amplitud máxima de la respuesta PSE después de la inducción no fue significativamente diferente de la línea de base ($F_{(5, 143)} = 0,905$, $p = 0,480$) (Figura 10A). El porcentaje medio de la respuesta PSE 10 min después de la HFS fue de $111,61 \pm 31,78$ % ($t = -1,788$ y $p = 0,080$), y 50 min después de la HFS fue de $94,53 \pm 41,41$ % ($t = 0,648$ y $p = 0,520$) (Figura 10B y 10C).

En los animales TG-Veh la HFS no indujo tampoco LTP, como lo evidencia que la amplitud máxima de la respuesta PSE después de la inducción no fue significativamente diferente de la línea de base ($F_{(6, 293)} = 1,146$; $p = 0,336$) (Figura 10A). La amplitud máxima relativa de la respuesta PSE 10 min después de la HFS fue de $91,14 \pm 15,41$ % ($t = 3,726$ y $p < 0,001$), mientras que 50 min después fue de $94,17 \pm 19,22$ % ($t = 1,965$ y $p = 0,053$) (Figura 10B y 10C).

En animales TG-BXT la HFS indujo LTP, como lo indica que la amplitud máxima de la respuesta PSE después de la inducción fue significativamente mayor que la línea de base ($F_{(6, 251)} = 9,394$; $p < 0,001$) (Figura 10A). El análisis *post hoc* mostró un aumento significativo de la amplitud máxima relativa de la respuesta PSE 10 min ($143,85 \pm 38,24$ %, $t = 5,186$, $p < 0,001$) y 50 min ($146,17 \pm 39,73$ %, $t = 5,460$, $p < 0,001$) después de la HFS (Figura 10B y 10C).

La amplitud máxima relativa de la PSE 10 min después de la HFS fue significativamente diferente entre los grupos experimentales ($F_{(3, 131)} = 24,377$, $p < 0,001$) (Figura 10B). El análisis *post hoc* reveló que la amplitud máxima relativa de la PSE de los animales WT-Veh fue significativamente mayor que la de los animales WT-BXT ($t = 1,970$, $p = 0,051$); del mismo modo, la amplitud máxima relativa de la PSE de los animales TG-BXT fue significativamente mayor que la de los animales TG-Veh ($t = 8,271$, $p < 0,001$), y significativamente más grande que de los animales WT-Veh ($t = 2,466$ y $p = 0,015$).

La amplitud máxima relativa de la PSE 50 min después de la HFS fue significativamente diferente entre los grupos experimentales ($F_{(3, 131)} = 26,582$, $p < 0,001$) (Figura 10C). El análisis *post hoc* mostró que la amplitud máxima relativa de la PSE de los animales WT-Veh fue significativamente mayor que la de los animales WT-BXT ($t = 5,497$, $p < 0,001$); de igual forma, la amplitud máxima relativa de la PSE de los animales TG-BXT fue significativamente mayor que la de los animales TG-Veh ($t = 7,009$; $p < 0,001$), pero no fue diferente de los animales WT-Veh ($t = 0,307$ y $p = 0,760$).

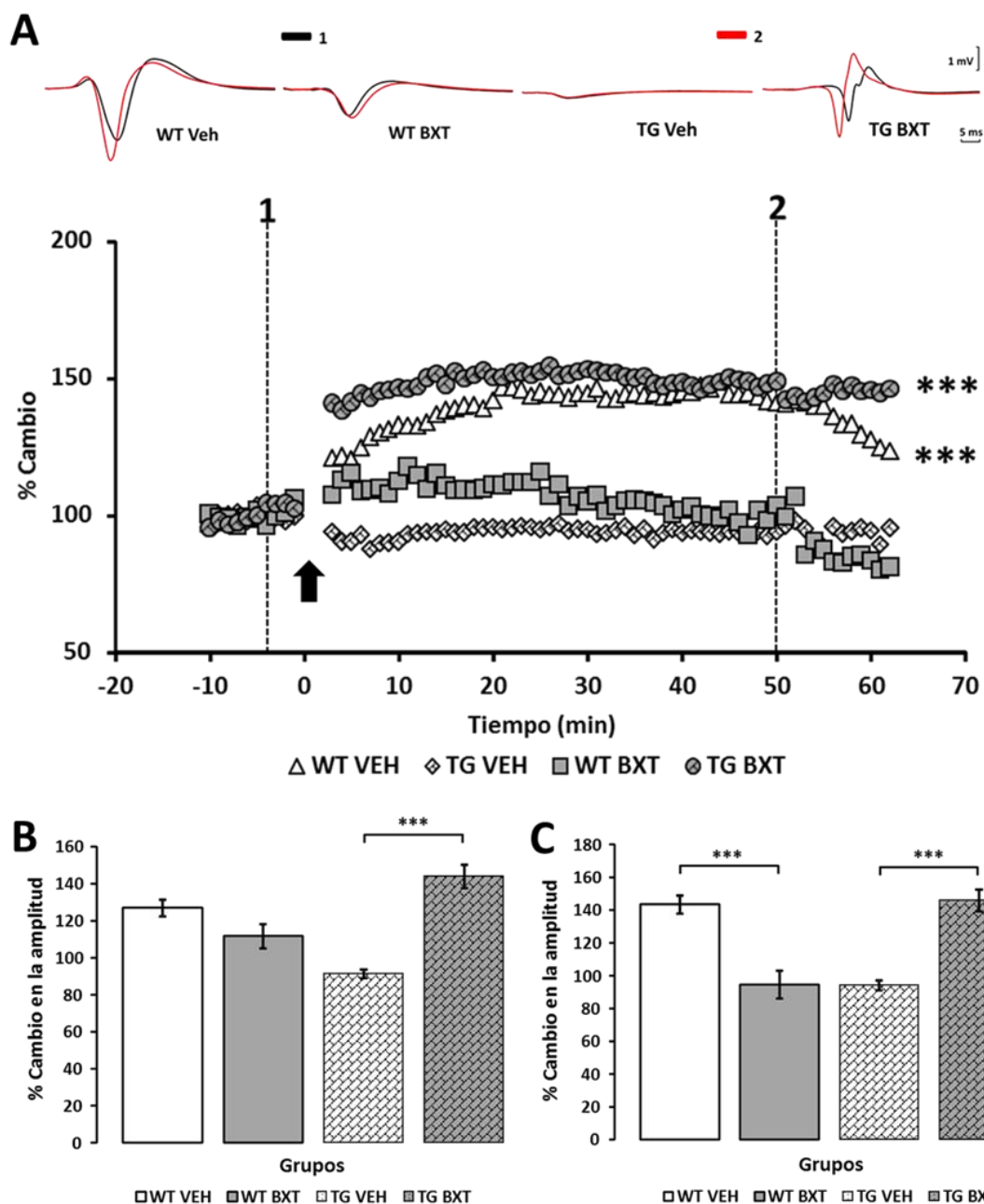


Figura 10. El fenotipo y el tratamiento farmacológico modificaron la potenciación a largo plazo en la sinapsis comisural CA3→CA1 en el hipocampo III: evolución temporal de la amplitud de la respuesta PSE. **A)** Cambio porcentual de la amplitud de la respuesta PSE con respecto a la línea de base tras la inducción con HFS (flecha negra) en cada uno de los grupos experimentales. Superposición de respuestas PSE registradas antes (1, negro) y después (2, rojo) de la inducción con HFS tomadas de animales representativos de cada uno de los grupos experimentales. **B)** Comparación del porcentaje de cambio de la amplitud de la respuesta PSE entre los diferentes grupos experimentales 10 minutos después de la inducción HFS (post-inducción). **C)** Comparación del porcentaje de cambio de la amplitud de la respuesta PSE entre los diferentes grupos experimentales 50 minutos después de la inducción HFS (mantenimiento). Se representa la media \pm el error estándar. Abreviaturas: ***, diferencias significativas entre grupos, $p < 0.001$.

6. Discusión

En esta investigación se evaluó el potencial efecto del bexaroteno, un agonista de receptores nucleares RXR, sobre la fisiología de la sinapsis CA3→CA1 en el hipocampo de ratones *wild Type* y triple transgénicos para la enfermedad de Alzheimer (3xTg-EA). Se usaron ratones 3xTG-EA senescentes (15 ± 1 meses) porque estos animales desarrollan un fenotipo neuropatológico progresivo relacionado con la edad, mostrando una fuerte presencia de placas amiloides y neurofibrillas de proteína tau hiperfosforilada en regiones como la corteza cerebral, el hipocampo y la amígdala después de los 12 meses de edad (Oddo et al., 2003). Se usó bexaroteno porque en dosis de 100mg/Kg/día provoca disminución en la cantidad de amiloide beta (A β), mejoría en las pruebas de memoria y aumento la actividad cortical en animales transgénicos (Cramer et al., 2012). Se encontró que: 1) los animales *wild-type* senescentes no mostraron alteraciones en el funcionamiento basal, ni en la plasticidad a corto y largo plazo de la sinapsis CA3→CA1; 2) los animales 3xTG-EA tuvieron deterioro de la actividad basal y la plasticidad a corto y largo plazo de la sinapsis CA3→CA1; y 3) mientras el bexaroteno mejoró el funcionamiento basal y la plasticidad a corto y largo plazo de la sinapsis CA3→CA1 en animales 3xTG-EA, deterioró esas mismas características en los animales *wild type*.

Se ha demostrado que uno de los principales características fisiopatológicas de la EA, es la sobreproducción y acumulación del A β . Esto ocurre primordialmente por un desbalance en el procesamiento proteolítico de la APP (Selkoe, 2001). La acumulación de A β conlleva, entre otras consecuencias, a la disrupción de las conexiones sinápticas y al daño de la transmisión sináptica (Bordji, et al., 2011).

Estudios *in vitro* e *in vivo* en modelos animales con sobre-expresión de la proteína APP, han mostrado que los oligómeros de A β en altas concentraciones interfieren sobre la eficiencia de la transmisión sináptica debido principalmente a la disminución de receptores superficiales de tipo AMPA y NMDA (Palop & Mucke, 2010). Por esto, el estudio de la relación entre la intensidad de estimulación y el tamaño de la respuesta resulta de vital importancia para entender los efectos ocasionados por el péptido A β sobre la transmisión sináptica.

En el presente estudio se evidenció que los animales 3xTG-EA presentaron una fuerte disminución en la transmisión sináptica basal en comparación con los *wild type*, como lo indica la disminución de la amplitud de la respuesta PSE. Estos resultados son aparentemente contradictorios con los reportados por Davis et al, 2014, quienes por técnicas de electrofisiología *in vivo* no encontraron cambios en la transmisión sináptica en ratones 3xTG-EA (Davis, Fox, & Gigg, 2014). Sin embargo, en ese trabajo se usaron animales de cuatro a seis meses de edad, en los que presumiblemente no han ocurrido aún alteraciones por acumulación anómala de A β , pues se sabe que después de los 12 meses de edad los animales 3xTG-EA presentan una clara expresión de las dos principales características de la EA, las placas amiloides y los ovillos neurofibrilares de la proteína tau hiperfosforilada (Oddo et al., 2003). En el mismo sentido de los resultados del presente trabajo, un estudio reciente mostró que la transmisión sináptica en rodajas de ratones 3xTG-EA de 8 meses de edad se encuentra disminuida con respecto a la de los animales *wild type* (Clark et al., 2015).

En esta tesis se encontró que los animales 3xTG-EA tratados con BXT por 28 días, recuperaron la transmisión basal en la sinapsis CA3 \rightarrow CA1, llegando casi al nivel de los animales *wild type*. Muchas investigaciones sugieren que la acumulación de A β es una de las características patológicas más importantes durante el desarrollo de la EA (Selkoe, 2001; Oddo et al., 2003; Palop & Mucke, 2010; & Davis et al., 2014). Recientemente, se ha demostrado que la ApoE facilita la degradación natural del péptido A β (Bomben, et al., 2013). Esta degradación del péptido A β depende de la capacidad de lipídación de la ApoE, y puede ocurrir en la microglía,

por enzimas como la neprilisina, o en el espacio extracelular por la enzima degradadora de la insulina (Jiang et al., 2008). En este sentido, se ha reportado que el BXT promueve la expresión de los genes codificantes para ApoE y su transportador ABCA1 por medio de la activación y heterodimerización de los receptores RXR con sus compañeros los receptores nucleares tipo PPAR γ y LXR, incrementando los mecanismos naturales de degradación de A β (Cramer et al., 2012; Ashleigh et al, 2013; LaClair et al., 2013 & Tousi, 2015).

Una línea de investigación diferente muestra que el BXT puede tener otros efectos independientes a los relacionados con la sobreexpresión de proteínas. Esta línea de investigación centra sus estudios en dos premisas importantes: por un lado, la capacidad que tiene el péptido A β en conjunto con el colesterol en la formación de canales amiloidogénicos neurotóxicos permeables a cationes y aniones en la membrana celular (Snyder et al., 2005). Y por otro lado, a los procesos de oligomerización del péptido A β , ya que una gran línea de evidencia sugiere que son los oligómeros de A β , más que la placas de amiloide, las principales especies neurotóxicas causantes de daño sináptico, la pérdida neuronal y el decremento de los procesos cognitivos (Bordji et al., 2011; Davis et al., 2014; Di Scala, et al., 2014). El estudio de Fantini et al., 2014, demostró que: 1) el bexaroteno tiene una estructura análoga al colesterol; 2) que el bexaroteno compite por el sitio de unión del colesterol al péptido A β ; 3) que el bexaroteno funciona como una inhibidor competitivo en la interacción colesterol-A β ; 4) la oligomerización de A β depende del colesterol; 3) y que el bexaroteno puede prevenir la formación de canales amiloidogénicos neurotóxicos (Fantini et al., 2014)

Teniendo en cuenta estas evidencias y los resultados encontrados en el presente estudio, se puede proponer que los animales 3xTG-EA tratados con BXT mejoran la eficiencia en la transmisión sináptica de la sinapsis CA3 \rightarrow CA1 del hipocampo debido a: 1) la sobreexpresión de proteínas involucradas en la degradación del péptido A β ; 2) prevención de la formación de canales amiloidogénicos tóxicos para la neurona.

Por muchos años se ha acumulado evidencia que sugiere que los procesos de memoria y aprendizaje se encuentran muy vinculados a los procesos de plasticidad sináptica y mejoramiento de la eficiencia en la transmisión sináptica (Bliss & Collingridge, 1993; Chapman et al., 1999; Marchetti & Marie, 2011; Filali et al., 2012). Los animales 3xTG-EA, en comparación con animales *wild type*, presentan fuertes déficits en el rendimiento durante pruebas comportamentales que evalúan procesos de aprendizaje y memoria como: el laberinto acuático de Morris; la prueba para el reconocimiento de objetos (Filali et al., 2012).; el laberinto radial de ocho brazos; y pruebas para examinar el aprendizaje pasivo de evitación (Stevens & Brown, 2014) Lo anterior sugiere que el déficit en procesos de memoria y aprendizaje en ratones 3xTG-AE se debe en gran medida a los daños ocurridos en la sinapsis por la acción del péptido A β , conllevando a un daño en la transmisión sináptica basal y en los procesos de plasticidad sináptica.(Oddo et al., 2003; Palop & Mucke, 2010).

En los ratones 3xTG-EA no se pudieron provocar procesos de facilitación o defacilitación por pulsos emparejados, ni tampoco LTP. Sin embargo, el tratamiento con BXT provocó recuperación de la plasticidad a corto y largo plazo, llegando a valores semejantes a los animales *wild type*. La ausencia de plasticidad por pulsos emparejados se ha asociado con alteración en los niveles de calcio presináptico (Zucker & Regehr, 2002), lo cual podría haber ocurrido en los animales 3xTG-EA. Se ha encontrado que la desregulación de la homeostasis del calcio en ratones 3xTG-EA resulta en acumulación exacerbada de calcio en la neurona (Stutzmann et al., 2006) y al aumento en la probabilidad de liberación de vesículas, afectando a la plasticidad por pulsos emparejados (Clark et al., 2015). La disminución de la ocurrencia de canales amiloidogénicos producida por el BXT podría evitar la entrada descontrolada de calcio a las terminales presinápticas, lo cual podría explicar parcialmente su acción benéfica sobre la plasticidad a corto plazo.

Por otro lado, la expresión de sinaptofisina, que está involucrada en la regulación de la endocitosis de las vesículas sinápticas durante la actividad neuronal (Kwon &

Chapman, 2011), está fuertemente disminuida en modelos murinos transgénicos y en cerebros de pacientes con EA (Sandoval-Hernández et al., 2015). Esta disminución de la sinaptofisina resultaría en alteraciones en la cantidad de vesículas sinápticas, lo que provocaría deficiencia en la transmisión sináptica. En efecto, animales *knockout* para la sinaptofisina muestran una fuerte disminución en el cociente R_2/R_1 comparándolos con los animales *wild type* (Janz et al., 1999). Un estudio reciente mostró que el tratamiento con agonistas de receptores LXR, receptores nucleares muy semejantes en función a los receptores RXR, promueve los niveles de metilación de genes relacionados con la sinapsis como sinapsina-1 y sinaptofisina y revierte los déficits cognoscitivos encontrados en los animales 3xTG-EA (Sandoval-Hernández et al., 2015), lo que sugiere que el efecto benéfico del BXT sobre la plasticidad a corto plazo podría explicarse, en parte, por aumento de la expresión de sinapsina y sinaptofisina.

En modelos transgénicos de la EA se ha encontrado una fuerte alteración de los mecanismos de plasticidad sináptica a largo plazo, lo que podría explicar el déficit que presentan en aprendizaje y memoria (Chapman et al., 1999; Rowan, et al., 2003; Marchetti & Marie, 2011 & Ma & Klann, 2012). Hasta donde se sabe, este trabajo es el primer reporte donde se realiza un protocolo de LTP *in vivo* en animales 3xTG-EA y se demuestra un déficit en este tipo de plasticidad a largo plazo. Los mecanismos celulares implicados en el daño en los procesos de LTP no son bien entendidos; sin embargo, estudios *in vitro* en modelos murinos de EA han mostrado que los oligómeros del péptido A β pueden inhibir la LTP en el hipocampo por la acumulación de los oligómeros de A β , que pueden inducir internalización o desensibilización de receptores NMDA o AMPA presentes en la membrana celular (Palop & Mucke, 2010), liberación de glutamato desde los astrocitos y activación de receptores NMDA extrasinápticos (Talantova et al., 2013). Otras investigaciones muestran que el péptido A β está implicado en la activación de la caspasa-3 en un nivel que no causa procesos de apoptosis pero que está involucrado en procesos de fosforilación de la subunidad GluR1 de los receptores AMPA (D'Amelio et al., 2011), así como también en procesos de clivaje de la proteína Akt-1 aumentando

la activación de GSK-3 β y promoviendo rutas relacionadas con la LTD (Jo et al., 2011)

Los mecanismos por los cuales el bexaroteno estaría mejorando los procesos de LTP no se conocen; sin embargo se sabe que puede evitar la acumulación excesiva de A β , además, se ha mostrado que el bexaroteno puede cambiar el perfil de expresión de algunos genes implicados en la neurogénesis, desarrollo de las proyecciones neuronales y diferenciación neuronal, incrementando la ramificación de las neuritas y la complejidad de las dendritas (Mounier et al., 2015)

Finalmente, se sabe que los niveles adecuados de colesterol y esfingolípidos así como la dinámica de cambio de la estructura y la composición lipídica de las membranas celulares que forman a las espinas dendríticas son determinantes para muchos procesos de memoria y aprendizaje. Los cambios en la composición lipídica en las espinas dendríticas puede modular la afinidad de los receptores glutamatérgicos (AMPA y NMDA) por sus ligandos, y modificar el balance entre receptores glutamatérgicos sinápticos y extrasinápticos, lo cual es esencial para la transmisión y la plasticidad sináptica (Dotti, Esteban, & Ledesma, 2014). Por los hallazgos realizados en esta investigación se puede inferir que el bexaroteno estaría causando efectos adversos en las sinapsis de los animales *wild type*. Estos efectos se relacionan con una fuerte salida de colesterol desde el tejido nervioso hacia la sangre ya que el bexaroteno incrementa la expresión de proteínas como la ApoE y ABCA1, importantes en la formación de moléculas HDL (Cramer et al., 2012); regula el transporte de colesterol (Fantini et al., 2014); y produce efectos secundarios como la hipercolesterolemia y la hipertrigliceridemia (Quéreux et al., 2013). Todo esto conllevando a una alteración de los procesos de transmisión y plasticidad sináptica.

7. Conclusiones

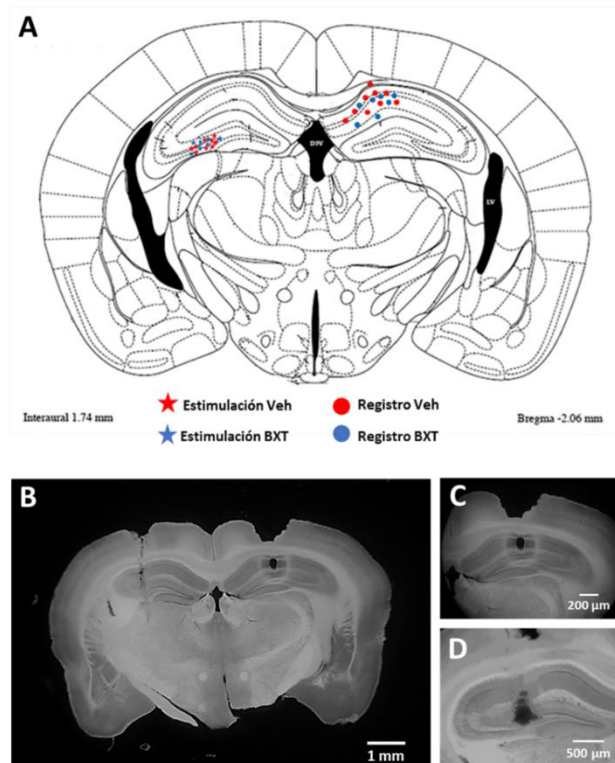
1. La transmisión sináptica basal en ratones 3xTG-EA senescentes se encuentra disminuida con respecto a la encontrada en animales *wild-type* de la misma edad.
2. La plasticidad por pulsos emparejados y la potenciación a largo plazo se encuentran severamente deterioradas en ratones 3xTG-EA senescentes con respecto a la plasticidad de animales *wild-type* de la misma edad.
3. La administración de bexaroteno durante 28 días a ratones 3xTG-EA senescentes recupera la transmisión sináptica basal y la plasticidad a corto y largo plazo en la sinapsis CA3 → CA1.
4. La administración de bexaroteno durante 28 días a ratones *wild-type* senescentes deteriora la transmisión sináptica basal y la plasticidad a corto y largo plazo en la sinapsis CA3 → CA1.
5. Por los hallazgos de este estudio y por conclusiones de anteriores investigaciones, el bexaroteno se convierte en una potencial alternativa terapéutica para remediar los daños sinápticos vistos durante la enfermedad de Alzheimer.

8. Perspectivas

La realización de esta tesis abre un considerable número de futuras líneas de investigación relacionadas con una nueva alternativa terapéutica para la enfermedad de Alzheimer. Sería muy importante hacer más estudios acerca de la forma exacta como el bexaroteno está actuando a nivel de la sinapsis. Se podrían realizar estudios electrofisiológicos para medir actividad neuronal unitaria, y así saber si el bexaroteno tiene la capacidad de promover el flujo de corrientes iónicas en las neuronas. Así se podría entender un poco más el mecanismo de acción del bexaroteno a nivel sináptico. También sería importante saber si el bexaroteno tiene la capacidad de reducir la carga del péptido A β o de la proteína tau hiperfosforilada dentro del cerebro de animales 3xTG-EA senescente. Una aproximación básica para esto, sería el conteo de placas amiloidogénicas y/u ovillos neurofibrilares en cerebros de ratones 3xTG-EA tratados y no con el bexaroteno por medio de técnicas inmunohistoquímicas.

9. Anexo 1. Esquema representativo de los lugares de la estimulación y del registro

Emplazamiento final de los electrodos de estimulación y registro. **A)** Esquema representativo de un corte coronal del cerebro de ratón 2 mm por detrás del punto Bregma. Se resumen los lugares de lesión electrolítica en cada uno de los animales experimentales, se muestran las lesiones provocadas con los electrodos de estimulación (círculos) y de registro (estrellas). El color azul representa los animales tratados con bexaroteno, el color rojo representa los animales tratados con vehículo. **B)** Microfotografía panorámica de un corte coronal de 100 μm de espesor del cerebro un animal representativo en la que se pueden observar las lesiones provocadas con los electrodos de estimulación (izquierda) y registro (derecha). **C)** Acercamiento de la lesión electrolítica provocada con el electrodo de registro. **D)** Acercamiento de la lesión electrolítica provocada con el electrodo de estimulación.



10. Bibliografía

- Andrew, F., & Ottavio, A. (2012). Is the Amyloid Hypothesis of Alzheimer's disease therapeutically relevant? *Biochemical Journal*, *446*(2), 165–177. <http://doi.org/10.1042/BJ20120653>.Is
- Ashleigh R. Price, Guilian Xu, Zoe B. Siemienski, Lisa A. Smithson, David R. Borchelt, Todd E. Golde, K. M. F. (2013). Comment on “ApoE-Directed Therapeutics Rapidly Clear β -Amyloid and Reverse Deficits in AD Mouse Models.” *Science (New York, N.Y.)*, *340*(6135), 3–5. <http://doi.org/10.1126/science.1233937>
- Bliss, T. V., & Collingridge, G. L. (1993). A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*, *361*(6407), 31–39. <http://doi.org/10.1038/361031a0>
- Bordji, K., Becerril-Ortega, J., & Buisson, A. (2011). Synapses, NMDA receptor activity and neuronal APP production in Alzheimer's disease. *Reviews in the Neurosciences*, *22*(3), 285–294. <http://doi.org/10.1515/RNS.2011.029>
- Boutajangout, A., & Wisniewski, T. (2013). The Innate Immune System in Alzheimer's Disease. *International Journal of Cell Biology*, *2013*, 576383. <http://doi.org/10.1155/2013/576383>
- Chapman, P. F., White, G. L., Jones, M. W., Cooper-Blacketer, D., Marshall, V. J., Irizarry, M., Hsiao, K. K. (1999). Impaired synaptic plasticity and learning in aged amyloid precursor protein transgenic mice. *Nature Neuroscience*, *2*(3), 271–276. <http://doi.org/10.1038/6374>
- Cirrito, J., Kang, J., Lee, J., & Stewart, F. (2008). Endocytosis is required for synaptic activity-dependent release of amyloid- β in vivo. *Neuron*, *58*(1), 42 –

51. Retrieved from

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0896627308001244>

- Clark, J. K., Furgerson, M., Crystal, J. D., Fechheimer, M., Furukawa, R., & Wagner, J. J. (2015). Alterations in synaptic plasticity coincide with deficits in spatial working memory in presymptomatic 3xTg-AD mice. *Neurobiology of Learning and Memory*, 125, 152–162.
<http://doi.org/10.1016/j.nlm.2015.09.003>
- Coulter, D. a, Yue, C., Ang, C. W., Weissinger, F., Goldberg, E., Hsu, F.-C., Takano, H. (2011). Hippocampal microcircuit dynamics probed using optical imaging approaches. *The Journal of Physiology*, 589(Pt 8), 1893–903.
<http://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.202184>
- Cramer, P. E., Cirrito, J. R., Wesson, D. W., Lee, C. Y. D., Karlo, J. C., Zinn, a. E., Landreth, G. E. (2012). ApoE-Directed Therapeutics Rapidly Clear β -Amyloid and Reverse Deficits in AD Mouse Models. *Science*, 335(2012), 1503–1506. <http://doi.org/10.1126/science.1217697>
- D'Amelio, M., Cavallucci, V., Middei, S., Marchetti, C., Pacioni, S., Ferri, A., Cecconi, F. (2011). Caspase-3 triggers early synaptic dysfunction in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nature Neuroscience*, 14(1), 69–76.
<http://doi.org/10.1038/nn.2709>
- Davis, K. E., Fox, S., & Gigg, J. (2014). Increased hippocampal excitability in the 3xTgAD mouse model for Alzheimer's disease in vivo. *PloS One*, 9(3), e91203. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0091203>
- Di Scala, C., Chahinian, H., Yahi, N., Garmy, N., & Fantini, J. (2014). Interaction of Alzheimer's β -Amyloid Peptides with Cholesterol: Mechanistic Insights into Amyloid Pore Formation. *Biochemistry*, 53(28), 4489–4502.
<http://doi.org/10.1021/bi500373k>
- Donkin, J. J., Stukas, S., Hirsch-Reinshagen, V., Namjoshi, D., Wilkinson, A., May, S., ... Wellington, C. L. (2010). ATP-binding cassette transporter A1 mediates the beneficial effects of the liver X receptor agonist GW3965 on object recognition memory and amyloid burden in amyloid precursor

- protein/presenilin 1 mice. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(44), 34144–54. <http://doi.org/10.1074/jbc.M110.108100>
- Dotti, C. G., Esteban, J. A., & Ledesma, M. D. (2014). Lipid dynamics at dendritic spines. *Frontiers in Neuroanatomy*, 8(August), 1–11. <http://doi.org/10.3389/fnana.2014.00076>
 - Dumas, J., & Newhouse, P. (2011). The cholinergic hypothesis of cognitive aging revisited again: cholinergic functional compensation. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 99(2), 254–261. <http://doi.org/10.1016/j.pbb.2011.02.022>.The
 - Fantini, J., Di Scala, C., Yahi, N., Troadec, J.-D., Sadelli, K., Chahinian, H., & Garmy, N. (2014). Bexarotene blocks calcium-permeable ion channels formed by neurotoxic Alzheimer's β -amyloid peptides. *ACS Chemical Neuroscience*, 5(3), 216–24. <http://doi.org/10.1021/cn400183w>
 - Filali, M., Lalonde, R., Theriault, P., Julien, C., Calon, F., & Planel, E. (2012). Cognitive and non-cognitive behaviors in the triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease expressing mutated APP, PS1, and Mapt (3xTg-AD). *Behavioural Brain Research*, 234(2), 334–342. <http://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.07.004>
 - Garcia-Osta, A., & Alberini, C. (2009). Amyloid beta mediates memory formation. *Learning & Memory*, 8, 267–272. <http://doi.org/10.1101/lm.1310209>.)
 - Janz, R., Südhof, T. C., Hammer, R. E., Unni, V., Siegelbaum, S. a, & Bolshakov, V. Y. (1999). Essential roles in synaptic plasticity for synaptogyrin I and synaptophysin I. *Neuron*, 24, 687–700. [http://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)81122-8](http://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)81122-8)
 - Jiang, Q., Lee, C. Y. D., Mandrekar, S., Wilkinson, B., Cramer, P., Zelcer, N., Landreth, G. E. (2008). ApoE promotes the proteolytic degradation of Abeta. *Neuron*, 58(5), 681–93. <http://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.04.010>
 - Jo, J., Whitcomb, D. J., Olsen, K. M., Kerrigan, T. L., Lo, S.-C., Bru-Mercier, G., Cho, K. (2011). A β 1–42 inhibition of LTP is mediated by a signaling

pathway involving caspase-3, Akt1 and GSK-3 β . *Nature Neuroscience*, 14(5), 545–547. <http://doi.org/10.1038/nn.2785>

- Kang, J., & Rivest, S. (2012). Lipid Metabolism and Neuroinflammation in Alzheimer's Disease: A Role for Liver X Receptors. *Endocrine Reviews*, 33(5), 715–746. <http://doi.org/10.1210/er.2011-1049>
- Kim, J. H., Anwyl, R., Suh, Y. H., Djamgoz, M. B., & Rowan, M. J. (2001). Use-dependent effects of amyloidogenic fragments of (beta)-amyloid precursor protein on synaptic plasticity in rat hippocampus in vivo. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 21(4), 1327–33. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11160403>
- Koldamova, R. P., Lefterov, I. M., Lefterova, M. I., & Lazo, J. S. (2001). Apolipoprotein A-I directly interacts with amyloid precursor protein and inhibits A β aggregation and toxicity. *Biochemistry*, 40(12), 3553–60. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11297421>
- Kwon, S. E., & Chapman, E. R. (2011). Synaptophysin Regulates the Kinetics of Synaptic Vesicle Endocytosis in Central Neurons. *Neuron*, 70(5), 847–854. <http://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.04.001>
- LaClair, K. D., Manaye, K. F., Lee, D. L., Allard, J. S., Savonenko, A. V, Troncoso, J. C., & Wong, P. C. (2013). Treatment with bexarotene, a compound that increases apolipoprotein-E, provides no cognitive benefit in mutant APP/PS1 mice. *Molecular Neurodegeneration*, 8(1), 18. <http://doi.org/10.1186/1750-1326-8-18>
- Lefebvre, P., Benomar, Y., & Staels, B. (2010). Retinoid X receptors: Common heterodimerization partners with distinct functions. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 21(11), 676–683. <http://doi.org/10.1016/j.tem.2010.06.009>
- Ma, T., & Klann, E. (2012). Amyloid β : linking synaptic plasticity failure to memory disruption in Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry*, 120(Suppl 1), 140–148. <http://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07506.x.Amyloid>

-
- Mandrekar-Colucci, A., & Landreth, G. (2011). Nuclear receptors as therapeutic targets for Alzheimer's disease. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 15(9), 1085–1097.
<http://doi.org/10.1517/14728222.2011.594043.Nuclear>
 - Marchetti, C., & Marie, H. (2011). Hippocampal synaptic plasticity in Alzheimer's disease: what have we learned so far from transgenic models? *Reviews in the Neurosciences*, 22(4), 373–402.
<http://doi.org/10.1515/RNS.2011.035>
 - Mounier, A., Georgiev, D., Nam, K. N., Fitz, N. F., Castranio, E. L., Wolfe, C. M., Koldamova, R. (2015). Bexarotene-Activated Retinoid X Receptors Regulate Neuronal Differentiation and Dendritic Complexity. *Journal of Neuroscience*, 35(34), 11862–11876.
<http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1001-15.2015>
 - Mu, Y., & Gage, F. H. (2011). Adult hippocampal neurogenesis and its role in Alzheimer's disease. *Molecular Neurodegeneration*, 6(1), 85.
<http://doi.org/10.1186/1750-1326-6-85>
 - Oddo, S., Caccamo, A., Shepherd, J. D., Murphy, M. P., Golde, T. E., Kaye, R., LaFerla, F. M. (2003). Triple-transgenic model of Alzheimer's Disease with plaques and tangles: Intracellular A β and synaptic dysfunction. *Neuron*, 39(3), 409–421. [http://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00434-3](http://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00434-3)
 - Padamsey, Z., & Emptage, N. J. (2011). Imaging synaptic plasticity. *Molecular Brain*, 4(1), 36. <http://doi.org/10.1186/1756-6606-4-36>
 - Palop, J. J., & Mucke, L. (2010). Amyloid- β -induced neuronal dysfunction in Alzheimer's disease: from synapses toward neural networks. *Nature Neuroscience*, 13(7), 812–818. <http://doi.org/10.1038/nn.2583>
 - Pooler, A. M., Noble, W., & Hanger, D. P. (2014). A role for tau at the synapse in Alzheimer's disease pathogenesis. *Neuropharmacology*, 76 Pt A, 1–8.
<http://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.09.018>
 - Rowan, M. J., Klyubin, I., Cullen, W. K., & Anwyl, R. (2003). Synaptic plasticity in animal models of early Alzheimer's disease. *Philosophical*

Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences, 358(1432), 821–828. <http://doi.org/10.1098/rstb.2002.1240>

- Sandoval-Hernández, A. G., Hernández, H. G., Restrepo, A., Muñoz, J. I., Bayon, G. F., Fernández, A. F., Arboleda, G. H. (2015). Liver X Receptor Agonist Modifies the DNA Methylation Profile of Synapse and Neurogenesis-Related Genes in the Triple Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Journal of Molecular Neuroscience*, (Jones 2012). <http://doi.org/10.1007/s12031-015-0665-8>
- Schellenberg, G., & Montine, T. (2012). The genetics and neuropathology of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica*, 124(3), 305–323. <http://doi.org/10.1007/s00401-012-0996-2>.The
- Selkoe, D. J. (2001). Alzheimer ' s Disease : Genes , Proteins , and Therapy. *Perspective*, 81(2), 741–767. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11274343>
- Snyder, E. M., Nong, Y., Almeida, C. G., Paul, S., Moran, T., Choi, E. Y., Greengard, P. (2005). Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid- β . *Nature Neuroscience*, 8(8), 1051–1058. <http://doi.org/10.1038/nn1503>
- Sodhi, R. K., & Singh, N. (2014). Retinoids as potential targets for Alzheimer's disease. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 120, 117–123. <http://doi.org/10.1016/j.pbb.2014.02.016>
- Stevens, L. M., & Brown, R. E. (2014). Reference and working memory deficits in the 3xTg-AD mouse between 2 and 15-months of age: A cross-sectional study. *Behavioural Brain Research*, 278C, 496–505. <http://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.10.033>
- Stutzmann, G. E., Smith, I., Caccamo, A., Oddo, S., Laferla, F. M., & Parker, I. (2006). Enhanced Ryanodine Receptor Recruitment Contributes to Ca²⁺ Disruptions in Young , Adult , and Aged Alzheimer ' s Disease Mice. *Neurobiology of Disease*, 26(19), 5180 –5189. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0739-06.2006>

-
- Sun, X., Jin, L., & Ling, P. (2012). Review of drugs for Alzheimer's disease. *Drug Discoveries & Therapeutics*, 6(6), 285–290.
<http://doi.org/10.5582/ddt.2012.v6.6.285>
 - Tousi, B. (2015). The emerging role of bexarotene in the treatment of Alzheimer's disease: current evidence. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 11, 311–5. <http://doi.org/10.2147/NDT.S61309>
 - Yang, Y., & Calakos, N. (2013). Presynaptic long-term plasticity. *Frontiers in Synaptic Neuroscience*, 5(October), 8.
<http://doi.org/10.3389/fnsyn.2013.00008>
 - Zhang, Y., Thompson, R., Zhang, H., & Xu, H. (2011). APP processing in Alzheimer's disease. *Molecular Brain*, 4(1), 3. <http://doi.org/10.1186/1756-6606-4-3>
 - Zolezzi, J. M., Bastías-Candia, S., Santos, M. J., & Inestrosa, N. C. (2014). Alzheimer's disease: Relevant molecular and physiopathological events affecting amyloid- β brain balance and the putative role of PPARs. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 6(July), 1–12.
<http://doi.org/10.3389/fnagi.2014.00176>
 - Zucker, R. S., & Regehr, W. G. (2002). Short-Term Synaptic Plasticity. *Annual Review of Physiology*, 64(1), 355–405.
<http://doi.org/10.1146/annurev.physiol.64.092501.114547>