

EFFECTOS DE LA ESTIMULACIÓN POSTNATAL EN EL PERFIL COGNITIVO Y EMOCIONAL DEL MODELO DE RATÓN 3xTgAD PARA LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Antoni Cañete Ramírez
TESIS DOCTORAL



**Universitat Autònoma
de Barcelona**

Bellaterra 2011



TESIS DOCTORAL DE
Toni Cañete Ramírez

**EFFECTOS DE LA ESTIMULACIÓN
POSTNATAL EN EL PERFIL COGNITIVO
Y EMOCIONAL DEL MODELO DE
RATÓN 3xTgAD PARA LA
ENFERMEDAD DE ALZHEIMER**

Depto. de Biología Celular, Fisiología e Inmunología.
Facultad de Medicina. Instituto de Neurociencias
Universidad Autónoma de Barcelona

Este trabajo ha sido realizado bajo la dirección del Doctor **Albert Fernández Teruel** y la Doctora **Lydia Giménez Lloret**, profesores del Departamento de Psiquiatría i Medicina legal, Unidad de Psicología Médica y miembros del Instituto de Neurociencias de la Universidad Autónoma de Barcelona.

Bellaterra, 2011

A mi familia,
y a mis amigos

AGRADECIMIENTOS

Parecía que nunca llegaría este momento, y ahora, después de tanto tiempo y de tantas personas que han participado directa e indirectamente en esta tesis, me invaden miles de pensamientos. Espero acordarme de todos vosotros que me habéis animado continuamente durante todos estos años.

En primer lloc, sense dubtes, vull agrair als meus directors de tesi, a la Dra Lydia Giménez-Llort, per donar-me la oportunitat de participar en aquest projecte i transmetre'm el seu entusiasme, i especialment al Dr Albert Fernández-Teruel per ajudar-me sempre, per la teva confiança i amistat, sense el teu esforç, aquesta tesi no estaria acabada.

I com no, molt especialment a les meves “marvellous” companyes y amigues, que hem passat períodes bipolars constants, realment sense el vostre ajut i recolzament no crec que ara estigués escrivint aquestes paraules. Moltes converses que m'han fet riure y gaudir de bogeries. El tripartit; que sempre estarà unit, Gloria, que compartim contractures, penes i alegries, Regina, que encara sembla que en qualsevol moment tinguessis que tornar d'un “finde” llarg. Gràcies pels bons moments. Esther, la teva amistat i la teva energia positiva ha sigut un regal durant tot aquest temps, moltíssimes gràcies per estar al meu costat en aquesta fase final. Al Marc i a la Yola, per començar junts i continuar essent els meus amics. A sa Carmeta, per les teves converses, a la Marta, que ets més important del que et penses. A la Sira, per fer-nos riure amb els teus menjars, al Jaume, per compensar tanta bogeria femenina. I a la Míriam que ja ets una Psico més.

A Magda y a Oscar, por vuestra buena amistad durante todo este tiempo y por esas cenitas en el paseo.

A tots aquells que han passat pel lab i la unitat, que hem compartit, hem connectat i que ara son bons amics, especialment a la Montseta, la Bárbara, la Helga, el Joanet, la Fina, a Lidia, a Heela i a la Sandreta.

A tots el “Euratuleros”, que ens heu visitat durant tres anys, thanks a lot for your affection and friendship.

Agraeixo als meus companys de la Unitat de Psicologia Mèdica, per preguntar-me i preocupar-se de com ho portava. I a l’Adolf, pel seu recolzament en els moments més importants.

A toda mi familia; a mis padres y a mis hermanas, por estar siempre a mi lado y aguantar mis cambios de humor con risas. A Fran, por tu apoyo, paciencia, comprensión y por ser tan especial. A mis dos sobrinas, Alba y Martina, por ser encantadoras, y ayudarme a recordar la infancia. A mi abuela, que me hizo ver la cruda realidad de la enfermedad y a toda mi familia Tinerfeña, en especial a Loli, a Luzma y Carolina.

A la colla “pesigolla”, Silvia, Montse, Luis, M^oCarmen, Jesús, Meri, Pili, Ferran, Mónica, Marian, Joao y especialmente a Paco, por estar a mi lado tantos años. A todos ellos que son gran parte de mi vida. A los astronautas Oscar y Sira, por vuestra amistad, cariño y hacerme viajar a otros planetas.

A Gemma, por acordarte siempre de los “canutillos” de cartón, a Maika por ser la mejor amiga-vecina, y a todos los que nos han ayudado a proveernos de “canutillos” de cartón y evitar males mayores entre los ratones.

Als ratolins i rates de laboratori que sense queixar-se ens faciliten el coneixement. A totes les persones que van fer aportacions a la Marató de TV3 i que gràcies a tots ells em pogut fer aquesta i d’altres feines. Bona part d’aquest treball ha sigut finançat per la Marató de TV3 n^o062930.

ABREVIATURAS

βA: Péptido beta amilode

ACE: Enzima acetilcolinesterasa, implicada en la eliminación de la Acetilcolina

ACh : Neurotransmisor acetilcolina

ACTH: Hormona adrenocorticótrona

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNc: Ácido desoxirribonucleico complementario

ApoE: Apolipoproteína E

ApoE-4: Alelo 4 del gen de la apolipoproteína E

APP: Proteína precursora Amiloide

BLA: Amígdala basolateral

CA: Prueba del Campo Abierto

ChAT: Enzima colina acetiltransferasa, implicada en la síntesis de la Acetilcolina

CORT: Hormona Corticosterona

CRH: Hormona liberadora de corticotropina o “Corticotropin-releasing hormone”

CT: Test de las esquinas o “*Corner test*”

DLB: Test de la Caja blanca/negra o “*dark-light box*”

EA: Enfermedad de Alzheimer

EH: Manipulación temprana o “*Early Handling*”

EP: Estimulación postnatal

GAL: Neuropeptido Galanina

GC: Hormona Glucocorticoide

HA: Acido homocisteico

hAPP: Proteína precursora Amiloide humana

HB: Prueba de la Tabla de 16 agujeros de Boissier o “*Hole board*”

HPA: Eje hipotálamo hipofisiario adrenal

ISRS: Inhibidores selectivos de la recaptación de la serotonina

LTP: Potenciación a largo plazo o “*Long Term Potentiation*”

NFT: Ovillos neurofibrilares o “*Neurofibrillar Tangles*”

NGF: Factores de crecimiento nervioso o "*nerve growth factor*"

NI: Aislamiento neonatal

NMDA: Receptores ionotrópicos de glutamato, N-metil-D-aspartato

MWM: Prueba del laberinto acuático de morris o "*Morris water maze*"

NTS: Estimulación táctil neonatal

M-1: Receptor muscarínico del tipo 1

MCI: Deterioro Cognitivo Leve o "*Mild Cognitive Impairment*"

MS: Separación maternal

PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas o "*platelet derived growth factor*"

PM: Test del laberinto en cruz elevado o "*Plus maze*"

PrP: Proteína prion o "Prion protein"

PS1: Gen de la Presenilina 1

PS2: Gen de la Presenilina 2

SCPD: Síntomas conductuales y psicológicos de la demencia

SMT: Prueba de las funciones sensorimotoras

TM: Test del laberinto hexagonal en túnel o "*hexagonal tunnel maze*"

3xTgAD: Modelo de ratón triple-transgénico

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	
2.1. ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	5
2.1.1. Alteraciones neuropatológicas.....	9
2.1.2. Alteraciones en los sistemas de neurotransmisión.....	18
2.1.3. El envejecimiento como factor de riesgo en la EA.....	20
2.1.4. Tratamiento y estrategias terapéuticas de la EA.....	22
2.2. MODELOS DE RATÓN PARA LA EA: ASPECTOS NEUROPATOLÓGICOS Y COGNITIVOS	24
2.2.1. Modelos de ratón no transgénico.....	25
2.2.2. Modelos Animales transgénicos para la EA.....	26
2.2.2.1. Diversos modelos de animales transgénicos.....	27
2.2.2.2. Ratones transgénicos para APP.....	28
2.2.2.3. Ratones transgénicos para Presenilina.....	31
2.2.2.4. Ratones doblemente transgénicos para β APP + PS1.....	31
2.2.2.5. Ratones transgénicos para APOE.....	31
2.2.2.6. Ratones transgénicos para TAU.....	32
2.2.3. El modelo triple transgénico (3xTgAD).....	34
2.2.3.1. Animales 3xTgAD a los 4 meses de edad.....	37
2.3. SÍNTOMAS NO COGNITIVOS EN LA EA Y SU MODELAJE EN RATONES TRANSGÉNICOS	
2.3.1. Los Síntomas conductuales y psicológicos de la demencia.....	39
2.3.2. Los SCPD en modelos de ratón para la EA.....	43
2.4. INFLUENCIA DE LOS FACTORES AMBIENTALES EN LA EA	
2.4.1. El estrés y la progresión de la EA.....	46
2.4.2. La Estimulación Postnatal.....	49
2.4.3. Estudios de estimulación postnatal en ratones.....	54

3. PLANTEAMIENTO ESPECÍFICO, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1. PLANTEAMIENTO ESPECÍFICO.....	59
3.2. OBJETIVOS.....	62
3.3. HIPÓTESIS.....	64

4. ESTUDIO I. ESTUDIO TRANSVERSAL DE LOS CICLOS CIRCADIANOS, NEOFOBIA Y FUNCIONES SENSORIMOTORAS BÁSICAS

4.1. MATERIALES I METODOS

4.1.1. Animales.....	69
4.1.2. Estudio conductuales.....	70
4.1.2.1. Test de neofobia o de las esquinas.....	70
4.1.2.2. Prueba de las funciones sensorimotoras.....	71
4.1.2.3. Actividad basal espontánea durante 24h en función de la edad.....	72
4.1.3. Análisis estadístico.....	73

4.2. RESULTADOS ESTUDIO I

4.2.1. Test de neofobia o de las esquinas.....	74
4.2.2. Prueba de las funciones sensorimotoras.....	75
4.2.3. Actividad espontánea durante 24h en función de la edad.....	80

4.3. DISCUSION ESTUDIO I

4.3.1. Funciones sensorimotoras en el ratón 3xTgAD.....	91
4.3.2. Respuestas de neofobia o inhibición conductual ante la novedad en el ratón 3xTgAD: Test de las esquinas.....	92
4.3.3. Ritmos circadianos de actividad basal y evolución del peso corporal en ratones 3xTgAD.....	93

4.4. CONCLUSIONES DEL ESTUDIO I.....	100
---	------------

5. ESTUDIO II. EFECTOS DE LA ESTIMULACIÓN POSTNATAL EN ANIMALES DE 4 MESES

5.1. MATERIALES Y METODOS

5.1.1. Animales.....	105
5.1.2. Estimulación postnatal.....	106
5.1.3. Estudios conductuales.....	107
5.1.3.1. Test de neofobia o <i>Corner test</i>	108
5.1.3.2. Laberinto acuático de Morris.....	109
5.1.3.3. Prueba del Campo abierto.....	113
5.1.3.4. Prueba del Laberinto en cruz elevado.....	114
5.1.3.5. Tabla de 16 agujeros de Boissier.....	115
5.1.3.6. Prueba de la Caja blanca/negra.....	115
5.1.3.7. Actividad espontánea basal durante 24h.....	117
5.1.3.8. Laberinto hexagonal en túnel.....	118
5.1.4. Análisis estadístico.....	119

5.2. RESULTADOS ESTUDIO II

5.2.1. Pesos.....	120
5.2.2. Test de Neofobia o test de las esquinas.....	121
5.2.3. Laberinto acuático de Morris.....	124
5.2.4. Prueba del Campo abierto.....	135
5.2.5. Prueba del Laberinto en cruz elevado.....	140
5.2.6. Tabla de 16 agujeros de Boissier.....	144
5.2.7. Prueba de la Caja blanca/negra.....	146
5.2.8. Actividad espontánea durante 24h.....	148
5.2.9. Laberinto hexagonal en túnel.....	154

5.3. DISCUSIÓN ESTUDIO II

5.3.1. Aprendizaje y memoria espacial en ratones 3xTgAD: efectos de la estimulación postnatal.....	156
5.3.2. Inhibición conductual ante la novedad, ansiedad incondicionada y conducta exploratoria en ratones 3xTgAD: efectos de la estimulación postnatal.....	166

5.3.3. Hiperactividad en ratones 3xTgAD y efectos de la estimulación postnatal.....	176
5.4. CONCLUSIONES ESTUDIO II.....	182
6. DISCUSIÓN GENERAL.....	187
7. CONCLUSIONES.....	211
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	215

1. RESUMEN

El ratón triple-transgénico (3xTgAD), portador de los transgenes humanos PS1_{M146V}, APP_{Swe} y Tau_{P301L} para la Enfermedad de Alzheimer (EA) desarrolla de manera progresiva las patologías cerebrales de la EA con un perfil temporal y anatómico específico que reproduce el patrón que tiene lugar en el cerebro humano.

Como parte del progreso en la caracterización y validación fenotípica de los ratones 3xTgAD como modelo animal de la EA, en la presente Tesis Doctoral se ha estudiado el perfil de síntomas no esencialmente cognitivos en diferentes estadios del desarrollo neuropatológico de estos animales transgénicos. Con este objetivo, se han estudiado los reflejos sensorimotores básicos, respuestas neofóbicas y ritmos circadianos de actividad motora, en ratones 3xTgAD de edades jóvenes (2 meses; estadio presintomático) y adultos (4 y 6 meses donde aparece acumulación de beta-amiloide intraneuronal), así como de edades más avanzadas (9, 12 y 15 meses; donde hay evolución progresiva y creciente de neuropatología beta-amiloide extracelular y de ovillos de proteína Tau). Los resultados, a todas las edades, indican que los ratones 3xTgAD presentan signos de neofobia incrementada y de hipoactividad motora basal, mientras que no evidencian problemas sensorimotores

En un segundo estudio, se ha caracterizado el perfil cognitivo de ratones 3xTgAD de 4 meses de edad mediante la evaluación clásica de aprendizaje y memoria espacial en el laberinto acuático de Morris, al tiempo que se ha caracterizado el perfil emotivo mediante la medida de las respuestas conductuales en los test de Campo Abierto, la Tabla de 16 agujeros de Boissier, la Caja Blanca/Negra, el Laberinto en Cruz elevado, el Laberinto en túnel radial y la actividad exploratoria circadiana. Un objetivo esencial de este estudio ha sido, además, valorar la capacidad de la estimulación postnatal (durante los primeros 21 días de vida) para prevenir algunos de los déficits o

alteraciones (cognitivas o/y emocionales) que presentan los ratones 3xTgAD de 4 meses.

Los resultados obtenidos demuestran que estos animales presentan alteraciones cognitivas en el laberinto acuático de Morris a los 4 meses de edad, y una incrementada inhibición conductual en respuesta a la novedad, como reflejo de miedo/ansiedad. Se han hallado diferencias de género, tanto en los test que muestran emotividad como actividad locomotora, siendo los machos 3xTgAD los que muestran una menor conducta ansiosa y una hiperactividad motora (respecto a las hembras transgénicas). El tratamiento de Estimulación Postnatal tiende a reducir el miedo/ansiedad, así como la hiperactividad relativa de los ratones 3xTgAD. Asimismo, la estimulación postnatal reduce significativamente los déficits cognitivos, de aprendizaje espacial, que muestran los ratones 3xTgAD.

En conclusión, los resultados replican los datos conductuales existentes en la literatura respecto a las fases iniciales de la neuropatología en ratón 3xTgAD y aportan nuevas evidencias sobre el perfil no cognitivo y emotivo de estos animales. Los resultados refuerzan también la hipótesis de que la beta-amiloide intraneuronal podría ser un marcador primario en el deterioro de la EA, así como que el tratamiento de Estimulación Postnatal presenta una capacidad protectora frente a los déficits cognitivos asociados a la enfermedad en etapas tempranas, además de efectos normalizadores de respuestas no cognitivas o emocionales.

Introducción

2. INTRODUCCIÓN

2.1. ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un trastorno neurodegenerativo cerebral progresivo, irreversible y relacionado con el envejecimiento, que produce pérdida progresiva de la memoria, deterioro intelectual y trastornos de la personalidad y del comportamiento (Corey-Bloom, 2002). Esta enfermedad ya fue descrita en 1906 por Alois Alzheimer, que describió las características clínicas y anatómicas de la paciente Auguste D, quien a los 51 años presentó un trastorno clínico de delirio celotípico, deterioro progresivo de la memoria, y finalmente desarrolló un cuadro de demencia con desorientación, afasia, apraxia, agnosia e incapacidad para realizar las actividades de la vida diaria.

La EA fue inicialmente considerada como una demencia presenil, y aunque su frecuencia fue baja durante la primera mitad del siglo XX, en las últimas décadas se ha convertido en un problema creciente en el orden médico, psiquiátrico, neurológico, epidemiológico, social y económico, particularmente en países que tienen altas expectativas de vida. Afecta entre el 5-10% de la población mayor de 65 años y hasta un 45% de los mayores de 85 años. Neuropatológicamente, el cerebro con EA se caracteriza por dos alteraciones estructurales principales: el desarrollo de placas seniles o placas amiloideas compuestas principalmente por el péptido beta-amiloide (βA) y el desarrollo de ovillos neurofibrilares o agregados hiperfosforilados de la proteína Tau (Katzman, 1986). Sin embargo, también se dan otras alteraciones moleculares y neuroquímicas críticas. Estos cambios son más aparentes en la neocorteza, las estructuras límbicas (hipocampo, amígdala y sus cortezas asociadas) y los núcleos particulares del tronco del encéfalo. Así, mientras que una forma de la EA, de aparición temprana, parece estar relacionada con un gen situado en el cromosoma 14 y también en el cromosoma 1, otra forma hereditaria y poco común, que se manifiesta antes de los sesenta años, parece relacionarse con una mutación en el gen de la beta-amiloide, situado en el cromosoma 21. En

cambio, otras formas más frecuentes y de aparición tardía podrían estar relacionadas con genes del cromosoma 19 (Selkoe, 1993). El conocimiento que se tiene actualmente de la enfermedad es muy extenso, aunque aún se desconoce la causa de la patología, lo que motiva que aún no se disponga de un tratamiento curativo o preventivo. La opinión más general es que la EA tiene un origen multifactorial en el que intervienen factores genéticos y ambientales (Cummings, 2003; Hsiung *et al.*, 2004).

La Enfermedad de Alzheimer se puede clasificar en diferentes tipos, según hagamos referencia a distintos aspectos. Así:

(1) Según la edad de inicio, la EA puede ser:

Presenil o temprana. Generalmente con clara relación familiar. Comienza antes de los 65 años, es de curso más rápido y constituye el 0,5-2,5% de los casos.

Senil o tardía. Aparece después de los 65 años, en su mayor parte es esporádica y de curso lento. Este tipo representa más del 95 % de los casos.

(2) Según la causa que la produce, la EA puede ser:

Familiar. Cuya causa parece ser genética coincidiendo en la mayoría de los casos con la EA presenil o de inicio precoz. Más de la mitad de los casos son causados por mutaciones autosómicas dominantes de tres genes localizados en cromosomas distintos: el gen de la proteína precursora Amiloide (APP) situado en el cromosoma 21; el gen de la Presenilina 1 (PS1), en el cromosoma 14; y el gen de la Presenilina 2 (PS2), en el cromosoma 1 (Rogaev *et al.*, 1995).

Esporádica. Coincide generalmente con los casos de EA senil o tardía. Se da en personas mayores de 65 años y es el tipo más común. Su causa es aún desconocida, aunque se han descrito distintos factores genéticos que aumentan el riesgo de padecer la enfermedad, como es la presencia del alelo $\epsilon 4$ del gen de la apolipoproteína E (ApoE-4), localizado en el cromosoma 19.

Si bien la gran mayoría de los casos de enfermedad de Alzheimer son del tipo esporádico, como se ha dicho, el trastorno se hereda con un patrón autosómico dominante en una fracción pequeña de los pacientes (menos del 1%). La identificación del gen mutante en algunas familias con una forma de la enfermedad autosómica dominante de inicio temprano proporciona un conocimiento considerable sobre los tipos de procesos que fallan en la EA. Se sospecha que el gen mutante responsable de la EA familiar podría residir en el cromosoma 21, fundamentalmente porque a menudo se desarrollan características clínicas y neuropatológicas similares en las personas con Síndrome de Down (una afección causada, en los casos típicos, por una copia supernumeraria del cromosoma 21), pero con un inicio mucho más temprano (aproximadamente a los 30 años en la mayoría de los casos). La prominencia de los depósitos de amiloide en la EA sugiere además que participa de alguna forma la mutación de un gen que codifica la proteína precursora del amiloide (APP). Este gen fue clonado en 1987 (Goldgaber *et al.*, 1987), observándose que se localizaba en el cromosoma 21. Esta observación finalmente condujo a la identificación de mutaciones del gen *APP* en casi 20 familias con la forma autosómica dominante de inicio temprano de la enfermedad de Alzheimer. Sin embargo, se debe señalar que sólo algunas familias con la enfermedad de inicio temprano, y ninguna de las que presentan inicio tardío, muestran estas mutaciones particulares (Goldgaber, 2006). Con anterioridad se identificaron los genes mutantes que subyacen a otras dos formas autosómicas dominantes adicionales de enfermedad de Alzheimer, los genes PS1 y PS2.

Por lo tanto, la mutación de cualquiera de varios genes parece ser suficiente para producir una forma hereditaria de enfermedad de Alzheimer. La forma más frecuente de enfermedad de Alzheimer se desarrolla tarde en la vida, y si bien los familiares de los individuos afectados corren mayor riesgo, el trastorno indudablemente no es hereditario en cualquier sentido simple. No obstante, el papel central de la APP en las familias con la forma de enfermedad de inicio temprano sugirió que dicha proteína podría estar ligada a la cadena de acontecimientos que culminaban en las formas “espontáneas” de enfermedad

de Alzheimer. En particular, el grupo de Strittmatter *et al.* (1993) postularon la hipótesis del importante papel que podría tener el depósito patológico de proteínas que forman complejos con un derivado de APP. Para probar esta idea, buscaron proteínas en el líquido cefalorraquídeo de pacientes con la enfermedad de Alzheimer que se unieran con alta afinidad. Una de las proteínas que detectaron fue la ApoE, molécula que normalmente acompaña al colesterol a través del torrente sanguíneo. Este hecho fue especialmente importante a la luz de un hallazgo realizado por este mismo grupo (Corder *et al.*, 1993), al descubrir que los miembros afectados de algunas familias con la forma hereditaria de inicio tardío mostraban una asociación de marcadores genéticos en el cromosoma 19. Este hallazgo fue de particular interés, porque un gen que codifica una isoforma de la apolipoproteína E (el alelo $\epsilon 4$) se localiza en la misma región del cromosoma 19 implicada por los estudios familiares. En consecuencia, estos autores comenzaron a explorar la asociación de los diferentes alelos de la apolipoproteína E con miembros afectados en familias con inicio tardío pero hereditario de la enfermedad de Alzheimer.

La ApoE participa en el transporte del colesterol sanguíneo y está presente en las neuronas y en las células gliales normales. En las placas amiloides su cantidad está muy aumentada. El alelo $\epsilon 2$, relativamente raro, podría proteger a algunas personas frente a la EA, mientras que el alelo $\epsilon 4$ incrementa el riesgo. Es más, cuanto mayor es el número de alelos $\epsilon 4$, menor es la edad de inicio de la enfermedad. Por su parte, el alelo $\epsilon 3$, el más frecuente en la población en general, parece tener un papel neutral en la enfermedad. De cualquier modo, no hay que olvidar que algunas personas pueden tener uno o ambos alelos $\epsilon 4$ sin padecer la enfermedad y que otras pueden padecerla sin tener ninguno. Por consiguiente, el alelo $\epsilon 4$ constituye un factor de riesgo de EA, pero no su causa (Strittmatter *et al.*, 1993). Todavía no se sabe cómo contribuye la ApoE $\epsilon 4$ al aumento del riesgo de EA, pero entre los posibles mecanismos se encuentran la facilitación de la acumulación del β -amiloide en las placas, la interacción con las concentraciones de colesterol y los efectos

sobre la muerte de las neuronas. Numerosos estudios indican, no obstante, que podrían existir otros factores de riesgo genético diferentes de los mencionados (Reitz *et al.*, 2010; Wollmer, 2010).

2.1.1. Alteraciones neuropatológicas

La EA se caracteriza por la presencia de graves alteraciones neurológicas a nivel tanto anatómico como fisiopatológico (Corey-Bloom, 2002). Este proceso neurodegenerativo múltiple del sistema nervioso central, se caracteriza clínicamente por la pérdida progresiva de la memoria a corto plazo y de la atención, seguida de la afectación de otras habilidades cognitivas, como el lenguaje y el pensamiento abstracto, el juicio crítico y el reconocimiento de lugares o personas. En las primeras fases de la enfermedad el impacto psicológico en el paciente es devastador, y en estadios avanzados, el enfermo evoluciona a un mutismo casi absoluto con un deterioro progresivo de sus capacidades motrices, pudiendo llegar a una total desconexión con el entorno y a la incapacidad de controlar sus funciones fisiológicas más simples.

A nivel anatómico, el estudio postmortem de los cerebros de pacientes con EA refleja, a simple vista, una disminución del peso y volumen cerebral y del espesor de la corteza, una mayor separación entre las circunvoluciones y aumento de la profundidad de los surcos. En su interior podemos observar una dilatación simétrica de los ventrículos cerebrales (Bouras, 1994; Wenk, 2003). Un estudio más detallado, a nivel microscópico, revela una reducción del número de neuronas, en especial en el hipocampo, la corteza temporo-parietal y la corteza frontal en la zona superficial, así como en diversos núcleos grises internos, como la sustancia innominada o región del núcleo basal de Meynert (núcleos de proyección cerebral colinérgicos) y el locus coeruleus, todas ellas áreas muy relacionadas con funciones cognitivas (Toledano, 2004). En muchas de las neuronas restantes se observan alteraciones patológicas como signos de atrofia del cuerpo y las prolongaciones (acortamiento y reducción del número de dendritas), disminución de las conexiones sinápticas neuronales,

engrosamientos y varicosidades a lo largo de las prolongaciones (Cuello, 2010).

Algunas veces se observan alteraciones que parecen indicar un intento, por parte de las neuronas supervivientes, de paliar las deficiencias que origina la pérdida neuronal de su alrededor (hipertrofia del cuerpo o las prolongaciones, dendritas de nueva aparición). El aumento en el número y el tamaño de las células gliales (principalmente astrocitos, aunque también microglía activada) es muy llamativo y parece estar muy relacionado con la neurodegeneración (Heneka, 2005 y 2010).

Sin embargo, aunque son muchas las alteraciones que se observan en los cerebros con EA, existen dos características histológicas típicas que sirven para diagnosticar "post-mortem", de forma definitiva, la enfermedad: alteraciones neurofibrilares extraneuronales (espacio extracelular) o "placas seniles", debidas principalmente a la formación y acumulación de la proteína β A, y acumulaciones fibrilares intraneuronales u "ovillos neurofibrilares", debidos a la proteína Tau (Querfurth y Laferla, 2010) (ver Figura 2.1).

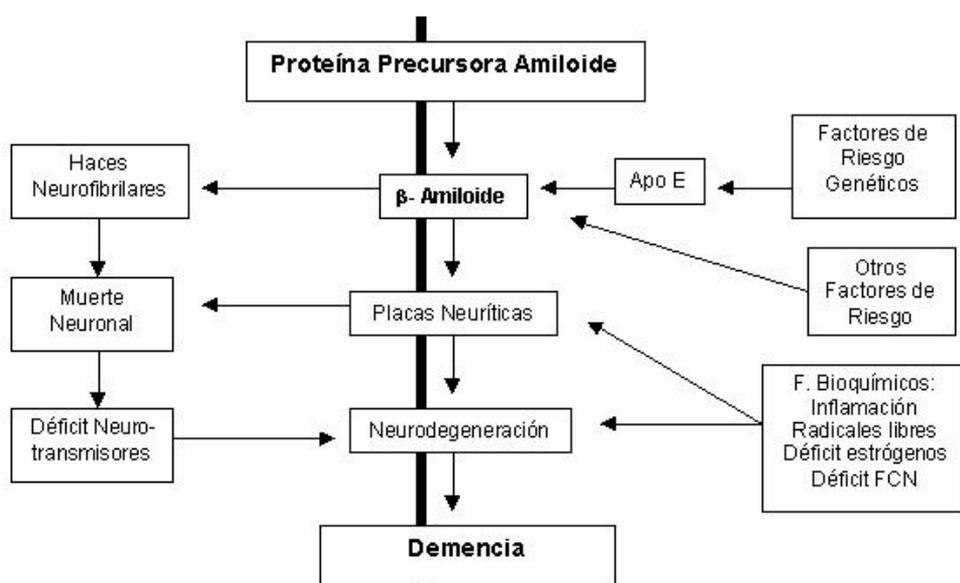


Figura 2.1. Esquema de la cascada patológica de la Enfermedad de Alzheimer. Fuente; http://www.medicosecuador.com/espanol/articulos_medicos/164.htm

El papel de la β -amiloide.

Las placas seniles, también denominadas placas amiloideas, consisten en depósitos extracelulares insolubles (péptidos de 39-43 aminoácidos de longitud), llamados beta-amiloide y abreviados como β A (Meyer-Luehmann *et al.*, 2003), que son el producto de la fragmentación de una proteína mayor, denominada proteína precursora del amiloide (APP, por sus siglas en Inglés). Esta proteína es indispensable para el crecimiento de las neuronas, para su supervivencia y su reparación (Priller, 2006; Turner, 2003). Aunque todavía no se sabe, definitivamente, si las placas son causa o consecuencia de la enfermedad, hay pruebas de que la formación de depósitos de amiloide puede ser un proceso fundamental en el desarrollo de la enfermedad. De hecho, la modificación de la estructura de la APP puede causar al menos una forma hereditaria de la enfermedad, caracterizada por mutaciones del gen de esta proteína. Estudios recientes han proporcionado información sustancial sobre la naturaleza del β -amiloide y su toxicidad neuronal, así como sobre la formación, depósito y reducción de las placas (Hillen, 2010; Kounnas, 2010).

El β A depende de la ruptura enzimática de la proteína precursora de amiloide (APP), y en este proceso de ruptura son responsables tres enzimas. La APP puede fragmentarse por acción de la α -secretasa, seguida de la acción de la γ -secretasa, de manera que se generan fragmentos solubles de APP (Esch *et al.*, 1990; LaFerla *et al.*, 2007; Mattson, 2004). Sin embargo, cuando sobre la APP actúa en primer lugar la β -secretasa seguida de la acción de γ -secretasa, se liberan los fragmentos de β A₁₋₄₀ y β A₁₋₄₂, dando lugar a una nueva proteína extracelular insoluble con conformación en hoja β plegada (López *et al.*, 1998; Querfurth y LaFerla, 2010), poniéndose así en marcha la ruta amiloidogénica (ver Figura 2.2). Este fragmento proteico se agrupa formando oligómeros insolubles que se depositan fuera de las neuronas en forma de placas seniles y en las paredes de las arterias de mediano calibre, dando origen a la angiopatía amiloide (Querfurth y LaFerla, 2010).

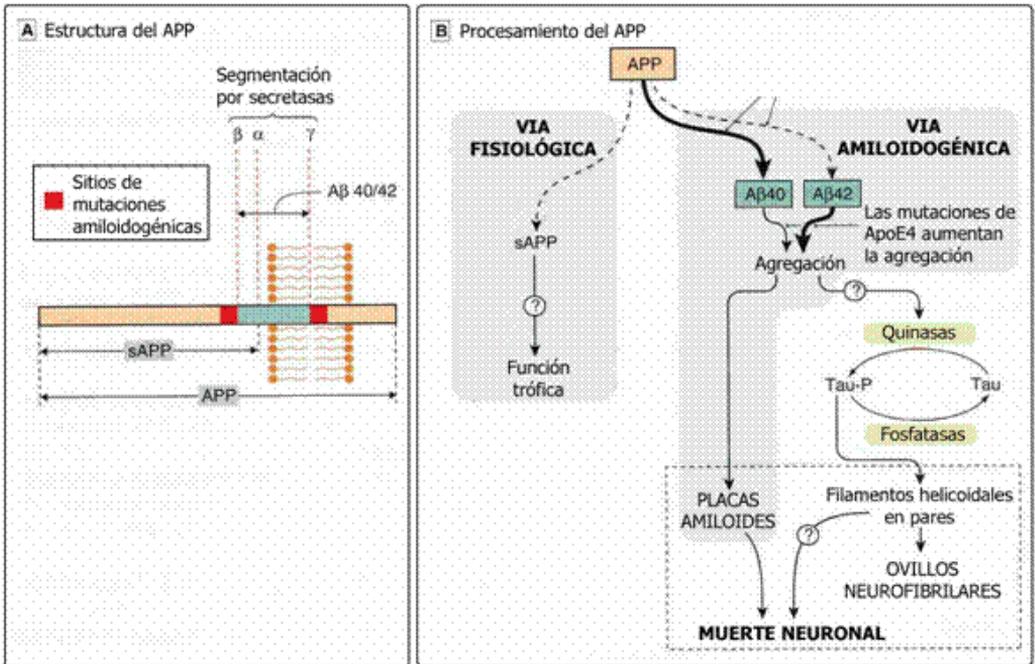


Figura 2.2. Cascada de la producción de β -amiloide a partir de APP. En (A) se muestra los sitios de segmentación de la APP por parte de las secretasas. En (B) se muestra la vía de procesamiento normal y la vía de procesamiento patológico por acción de las β - y γ -secretasas, para originar los péptidos amiloides βA_{40} y βA_{42} , cuya agregación promueve la formación de placas amiloides y ovillos neurofibrilares. Fuente; Novartis http://www.down21.org/salud/salud/Alzheimer_sd.htm

La causa que provoca la agregación de la βA y la posterior formación de las placas seniles no es del todo conocida, y tampoco lo es el origen de su toxicidad, aunque numerosos autores han sugerido el papel relevante del estrés oxidativo (Boyd-Kimball, 2005; Cruz-Sánchez *et al.*, 2010), las disfunciones en la homeostasis del calcio neuronal (Green y LaFerla, 2008; Isaacs, 2006) o los procesos inflamatorios (Dudal *et al.*, 2004; Eikelenboom *et al.*, 2006) como origen de tal toxicidad (Querfurth y LaFerla, 2010).

Este fragmento β del amiloide también estimula el aumento intracelular de calcio, activando dos procesos que conducen a la muerte de la neurona, como son la citotoxicidad por calcio y la degeneración neurofibrilar mediada por la proteína Tau. Parece ser que el amiloide, por medio de esta movilización e incremento del calcio intracelular, provoca la fosforilación de la proteína Tau,

dando lugar a los ovillos neurofibrilares y en última instancia produciendo la muerte neuronal (LaFerla, 2010; Oddo *et al.*, 2007, 2009; Querfurth *et al.*, 2010). Esto sugiere que la relación entre β A y Tau es predominantemente (si no exclusivamente) unidireccional, lo que es consistente con la hipótesis de la cascada amiloide y puede explicar que los desordenes únicos de Tau carezcan (o están desprovistos) de patología de beta-amiloide (Oddo *et al.*, 2007, 2009).

El papel de las Presenilinas.

Son proteínas de membrana que han sido propuestas como reguladoras del procesamiento de la proteína APP, por medio de su acción sobre la secretasa gamma, una enzima que digiere la APP. También se piensa que las presenilinas están implicadas en la degradación del receptor Notch (proteína receptora de señales inhibitorias que modula los patrones conformacionales del sistema nervioso durante las fases tempranas del desarrollo, Martys-Zage *et al.*, 2000), de modo que las presenilinas o bien regulan directamente la actividad de la secretasa gamma, o bien ellas mismas son enzimas con actividad proteasa.

La preselinina-1 (PS1) es una proteína con siete dominios transmembrana, codificada por un gen localizado en el cromosoma 14, y podría ser una de las enzimas que rompen la APP y originan la producción de β -amiloide. Además, las presenilinas tienen muchas otras funciones, entre las que se encuentra su participación en la apoptosis, y también en la comunicación intercelular, a través del mantenimiento de las sinapsis. Incluso tienen un papel durante el desarrollo embrionario similar a la de la proteína Notch-3. Se han descrito más de 50 mutaciones en esta proteína (*PS1*) que producen la EA familiar autosómica dominante, de inicio entre los 30 y 50 años, siendo las mutaciones en la PS1 la causa más frecuente de EA hereditaria. Sin embargo, todavía queda por determinar cuál es la función o proceso que, una vez alterada/o en pacientes con mutaciones de la presenilina, inicia la enfermedad. Aunque se

sabe que se inicia antes cuando se presenta la PS1 que la PS2 (Hutton y Hardy, 1997).

La preselinina-2 (PS2) es una proteína transmembrana con una secuencia similar a la PS1, codificada por un gen localizado en el cromosoma1. No se conoce bien la función de esta proteína, pero se han descrito 5 mutaciones en este gen, que producen la EA familiar en edades entre los 30 y 65 años (por tanto presenta unos límites de edad más amplios que las anteriores mutaciones).

El papel de la proteína Tau.

La proteína Tau juega un papel fundamental en la modulación de la formación y estabilización de los microtúbulos, a través de su fosforilación. Estos microtúbulos son polímeros claves de la arquitectura o citoesqueleto neuronal (Hernández y Ávila, 2007) y son además esenciales para mantener la dinámica del citoplasma, en los procesos de transporte en el interior de la neurona y en la formación del huso mitótico en células en división. En la EA, debido a una alteración de las señales regulatorias, Tau deja de cumplir su papel en el mantenimiento de la estabilidad del citoesqueleto y se transforma (por cambios químicos que resultan en su hiperfosforilación) en una proteína con una capacidad aberrante de asociarse consigo misma para formar polímeros intracelulares (agregación anormal), que conllevan la desintegración del sistema de transporte de la neurona. Dichos polímeros de Tau son los que se organizan en las estructuras helicoidales altamente resistentes, formando los llamados ovillos neurofibrilares (NFT, "Neurofibrillar Tangles"), que son estructuras anómalas de la neurona, cuya presencia provoca serios trastornos en la actividad celular que la llevan a una pérdida de su capacidad de transmitir mensajes nerviosos y finalmente al proceso neurodegenerativo (Ding y Johnson, 2008; Xie *et al.*, 1998). Se sabe que las neuronas que contienen estos NFT pierden su capacidad funcional y muchas de ellas mueren, como se

evidencia por la presencia de residuos neuronales que contienen dichos ovillos en el cerebro de pacientes con la enfermedad de Alzheimer.

Los NFT constituyen la principal lesión intraneuronal y se encuentran fundamentalmente en los cuerpos neuronales y dendritas apicales, aunque en menor proporción se detectan lesiones neurofibrilares (también formadas por NFT) en dendritas distales como los filamentos de la neuropila, y en neuritas distróficas que rodean los núcleos centrales de algunas placas del amiloide.

Sin embargo, hoy en día no existe consenso acerca de cómo la deposición del amiloide lleva a la demencia, ni si los depósitos de β A son suficientes por sí solos para causar la enfermedad. Fundamentalmente es debido a que los estudios de EA ya indicaban que las placas seniles se encontraban tanto en cerebros con la enfermedad como en los controles, siempre que se tratara de ancianos, lo que sugería que tales placas podrían ser marcadores de senilidad más que de demencia. En apoyo de esto, existe evidencia de que la distrofia neurítica se correlaciona con la expresión de formas de demencia clínica y que los pacientes pueden tolerar ciertos niveles de amiloidosis antes de presentar signos de disturbios cognitivos. También en relación a esta hipótesis, se descubrió una vacuna experimental que causaba la eliminación de estas placas pero no tenía efecto sobre la demencia (Holmes *et al.*, 2008). La formación de componentes del amiloide es común en el envejecimiento normal, y en casos muy raros se encuentran ovillos sin la presencia de amiloide. De esta forma, el β A posiblemente precedería a la formación de ovillos neurofibrilares (NFT). Sin embargo, es posible que los dos eventos celulares claves en la EA, formación de NFT y de placas seniles, lleven en forma complementaria a la pérdida de la actividad de las neuronas afectadas. A pesar de que la generación de NFT y la deposición del amiloide son fenómenos molecularmente independientes, podrían tener alguna relación a nivel de funcionamiento neuronal, aunque hoy en día este sigue siendo un debate abierto entre la opción que apuesta por la proteína Tau como desencadenante (teoría de los *Tauistas*; Mudher y Lovestone, 2002) y la que le da mayor

relevancia al beta-amiloide como agente etiológico primario de la EA (teoría de los *Baptistas*; Hardy y Allsop, 1991).

El papel de la Apolipoproteína E.

La Apolipoproteína E es una lipoproteína transportadora de colesterol codificada en el cromosoma 19 que se considera como un factor de riesgo para la EA (Hsiung *et al.*, 2004). Su secuencia de aminoácido presenta diversos polimorfismos (desde el punto de vista genético se habla de polimorfismo cuando una mutación se presenta en más del 1 % de la población). Los polimorfismos más frecuentes en la población son el polimorfismo $\epsilon 3$ (presente en el 80 %), y los polimorfismos $\epsilon 2$ y $\epsilon 4$ (presentes en el 5 y 15 % de la población). Se conoce que el polimorfismo $\epsilon 4$ es más frecuente en la EA que en la población general y que aparece en el 50 % de los pacientes con EA (Roses, 1994). La existencia de este polimorfismo de un modo homocigoto (alelos $\epsilon 4$ - $\epsilon 4$), aumenta aún más el riesgo de padecer la EA y adelanta en aproximadamente 10 años su inicio. Por el contrario, la presencia del polimorfismo $\epsilon 2$ parece que disminuye el riesgo de padecer la EA (Roses, 1997). La influencia de estos polimorfismos para padecer EA parece seguir un patrón aditivo, siendo el riesgo mayor en sujetos $\epsilon 4/4$, luego $4/3$, $3/3$, $4/2$, $3/2$ y $2/2$, por este orden.

Parece ser que la Apo-E se encuentra en todas las estructuras afectadas por lesiones de la EA: en las placas seniles, los ovillos neurofibrilares y los depósitos de amiloide perivascular. Se desconoce si su papel es el de reforzar estas formaciones o bien el de facilitar el añadido de nuevas moléculas que favorezcan el crecimiento (Waring *et al.*, 2008). En cambio, se ha estudiado la relación del desarrollo neurodegenerativo con la alteración de la actividad de lipoproteínas neuronales así como de la homeostasis del colesterol y de otros lípidos implicados en la actividad neuronal (Sekler *et al.*, 2008). El colesterol influye en la actividad de las enzimas involucradas en el metabolismo de la

proteína precursora del amiloide (APP) y en la producción de péptidos-amiloide (Kuo *et al.*, 1998).

Activación microglial e hipótesis de la “Neuroinmunomodulación”.

Las células microgliales, descritas por primera vez en 1932 por Del Rio Hortega, son consideradas como el macrófago del cerebro, capaz de realizar fagocitosis y presentación de antígenos, lo que las convierte en las células representantes del sistema inmune en el SNC (Hanisch *et al.*, 2007). La activación microglial se produce por la detección de las señales de daño. Existen una gran variedad de señales, tales como estructuras bacterianas, virales y fúngicas, proteínas endógenas anormales, anticuerpos y factores de complemento entre otros, que inducen la liberación de factores citotóxicos y citoquinas pro-inflamatorias. Esta activación microglial origina un fenómeno neuroinflamatorio que parece estar directamente relacionado con la degeneración neuronal, principalmente por efecto de las moléculas pro-inflamatorias (Fernández *et al.*, 2008). Tal evidencia ha llevado a implicar las microglías y las citoquinas como agentes claves en el desarrollo de desórdenes neurodegenerativos como la EA (Von Bernhardi, 2007).

Por otra parte, un estudio reciente sugiere que la β A podría tener una función protectora, como parte del sistema inmunológico (Soscia *et al.*, 2010). Los investigadores defienden la hipótesis de que la β A sería en realidad parte del sistema Inmunitario innato y actuaría en defensa contra los agentes patógenos. Estos autores mantienen la hipótesis de que los factores que provocan la hiperactividad del sistema inmune innato (no sólo ante infección, sino también ante traumatismos craneoencefálicos y accidentes cerebro-vasculares) podrían causar un depósito excesivo de β A. Así que, si el amiloide en placas realmente no fuese lo que hasta ahora se pensaba, esto es, el resultado de la acumulación de proteína de desecho, podría tener un papel muy activo en esa reacción de defensa frente a una agresión en el cerebro. De confirmarse esta teoría, tendría importantes consecuencias porque permitiría buscar nuevas

dianas vinculadas con factores de riesgo que incrementen la proteína β A y el riesgo de la EA.

Otros factores crónicos que se han relacionado con un incremento del riesgo de padecer EA son las alteraciones en la regulación del colesterol, cuadros diabéticos, constantes infecciones, un alto consumo de grasas y la deficiencia de vitamina B12, entre otros (Fernández *et al.*, 2008).

2.1.2. Alteraciones en la neurotransmisión

Durante el proceso de degeneración neurofibrilar que caracteriza la Enfermedad de Alzheimer, se produce una pérdida notable de los niveles de ciertos neurotransmisores. Estas alteraciones en los sistemas de neurotransmisión han sido confirmadas por numerosos trabajos (p.ej. De la Morena-Vicente *et al.*, 2006).

Las neuronas que mayoritariamente se afectan, son las neuronas colinérgicas, cuyo neurotransmisor es la acetilcolina (ACh), sobre todo en el hipocampo y en la neocorteza. Esto dio paso a la primera teoría etiopatogénica de la EA, la “teoría colinérgica” (Coyle *et al.*, 1983; Sara, 1989). La acetilcolina (ACh) es sintetizada por la enzima colina acetiltransferasa (ChAT), y la mayor fuente de ChAT reside en el núcleo basal de Meynert (localizado en el prosencéfalo basal y que proyecta hacia la neocorteza), una de las primeras zonas que se altera en la EA, mientras que otros núcleos colinérgicos se hallan en las neuronas del septum medial que proyectan al hipocampo. Existe una correlación entre la disminución del nivel de ChAT y los trastornos de la memoria y otras funciones cognitivas de la EA (Phillis, 2005; Whitehouse *et al.*, 1981, 1982). Así que, la recuperación de los niveles de ACh y ChAT, supondría hipotéticamente una mejoría de los síntomas de la enfermedad. También hay alteraciones en los receptores colinérgicos, con disminución de los receptores muscarínicos M2 presinápticos y de receptores nicotínicos (Caccamo *et al.*, 2006, 2009; Fisher, 2008; Oddo *et al.*, 2006c). Los enfoques del tratamiento

colinérgico han incluido la administración del precursor ACh, estimulación directa del receptor colinérgico y estimulación indirecta colinérgica (Schneider, 1998). Por desgracia, la mayoría de estas estrategias colinérgicas han resultado ineficaces, a veces efectivas pero demasiado tóxicas o bien no se han desarrollado por completo. El uso de fármacos inhibidores de la acetilcolinesterasa (ACE; enzima implicada en la eliminación de la ACh) es la base de algunos de los tratamientos farmacológicos actuales como, por ejemplo, la tacrina, el donecepilo y la rivastigmina. No obstante, los resultados terapéuticos suelen ser modestos y afectan solo a una minoría de pacientes (Fisher, 2008; Martínez Lage *et al.* 2001; Samadi *et al.*, 2011).

Otros sistemas de neurotransmisores que aparecen disfuncionales en la EA son el serotoninérgico, noradrenérgico, y dopaminérgico. Todos ellos tienen papel regulador de las células corticales. La serotonina está disminuida en la corteza cerebral y selectivamente en otras áreas. Los fármacos inhibidores selectivos de la recaptación de la serotonina (ISRS) como, por ejemplo, la fluoxetina, la paroxetina y el citalopram, se utilizan con éxito contra la depresión en la EA (Agüera Ortiz, 1998; Nelson *et al.*, 2007). Dado su perfil anticolinérgico, no deberían emplearse los fármacos antidepresivos tricíclicos. Aunque la indicación principal para la utilización de los ISRS en la enfermedad de Alzheimer es el tratamiento de los cuadros depresivos, según su perfil farmacológico, estos medicamentos pueden mejorar otros síntomas como la ansiedad, la irritabilidad, los estados de agitación y agresividad, la impulsividad y el insomnio (Martín Carrasco *et al.*, 2002).

Las células piramidales de la corteza cerebral y del hipocampo utilizan el glutamato como neurotransmisor (neurotransmisión glutamatérgica) y poseen un gran número de receptores NMDA para el glutamato en sus membranas. Estos receptores son fundamentales para los mecanismos sinápticos del aprendizaje y la memoria, se encuentran selectiva y diferencialmente disminuidos en las áreas lesionadas por la EA y existe una relación positiva entre la alteración de los mismos y los déficits cognitivos (Sze, 2000). Las

alteraciones de estos receptores en la enfermedad de Alzheimer causan la muerte neuronal por toxicidad, a través de una cascada de cambios metabólicos (sobreactivación de receptores ionotrópicos de glutamato) que termina con la entrada masiva de calcio en la célula y su muerte (Fernández-Teruel, 2008; Martínez Lage *et al.* 2001). Por este motivo, la utilización de bloqueantes glutamatérgicos (antagonista de los receptores NMDA) como la memantina, pueden retardar la muerte neuronal en la Enfermedad de Alzheimer, a través de sus propiedades neuroprotectoras, antiexcitotóxicas y potenciadoras de memoria (Butterfield *et al.*, 2003).

2.1.3. El envejecimiento como factor de riesgo

Durante el transcurso del envejecimiento normal, el cerebro sufre numerosas alteraciones: mueren las neuronas de algunas regiones cerebrales (aunque no la mayoría de las neuronas importantes para el aprendizaje); se atrofian algunas neuronas y sus conexiones, especialmente en regiones importantes para el aprendizaje, la memoria, la planificación y otras actividades mentales complejas; aparecen redes neurofibrilares y placas amiloideas en algunas regiones cerebrales; aumenta la susceptibilidad de las mitocondrias a las lesiones, y aumentan la inflamación y la carga oxidativa (Martinez Lage *et al.*, 2001).

En individuos sanos, el impacto de estas alteraciones puede ser ligero, produciendo diferentes grados de pérdida de la memoria, pero en los pacientes con EA algunas de ellas son mucho más pronunciadas. Se están realizando numerosos estudios sobre los procesos implicados en el envejecimiento normal del cerebro, con el fin de conocer mejor sus diferencias con lo que ocurre en la EA. Entre los aspectos más investigados se encuentran los mecanismos oxidativos y la posible participación de las cardiopatías o la hipertensión (Querfurth y LaFerla, 2010). En este sentido, se sabe que las enfermedades cerebrovasculares constituyen la segunda causa más frecuente

de demencia, y hay indicios de que los infartos cerebrales y la EA podrían estar relacionados (Mattson, 2004).

El daño producido por el exceso de radicales libres es algo asociado a los procesos de envejecimiento y en la EA, el daño oxidativo, juega un papel importante ya que los radicales libres atacan a las neuronas produciendo la oxidación de lípidos, proteínas y ADN, lo que se traduce en muerte neuronal (Markesbery et al., 1999; Martínez Lage et al., 2001). En condiciones normales los radicales libres son controlados por una eficiente cascada de mecanismos de antioxidación, que incluye tanto la intervención de diferentes enzimas antioxidantes como de agentes antioxidantes no-enzimáticos. Sin embargo, durante los procesos neurodegenerativos se produce una descompensación entre la producción de los radicales libres y la defensa antioxidante celular, como consecuencia de esto se producen fallos en diferentes funciones biológicas, conduciendo a la muerte celular (Mattson, 2004).

Por otro lado, en cerebros con Alzheimer se producen un gran número de *factores neuro-inflamatorios* como son: inmunoproteínas y citoquinas generadas por neuronas, astrocitos y microglia (además de la generación de radicales libres), contribuyendo a agravar las situaciones de daño oxidativo. De manera que el daño oxidativo y la cascada neuro-inflamatoria contribuyen de forma paralela a la patogénesis de esta enfermedad, ofreciendo nuevas estrategias para el desarrollo de fármacos. De acuerdo con el punto de intervención farmacológico se podrían clasificar como: antioxidantes, captadores de radicales libres o anti-inflamatorios neuronales (Engelhart et al., 2000; Thal 2000).

En el cerebro existen, o se pueden formar en determinadas circunstancias, sustancias que regulan el funcionamiento neuronal. Unas actúan en procesos de crecimiento, adaptación y/o recuperación de neuronas o de sus funciones, como el Factor de Crecimiento Nervioso o NGF (*nerve growth factor*), que se relaciona con el sistema colinérgico ascendente. En cambio, otras sustancias

actúan en procesos de muerte, involución o disfunción de las neuronas, y a estas sustancias se les denominan "Factores de envejecimiento" ("factores de necrosis" o "factores de muerte celular"). En la EA, de una manera genérica, se ha observado que existe un déficit de factores de crecimiento y un exceso de factores de envejecimiento. Este balance desequilibrado es considerado por muchos autores como la clave de la neurodegeneración, no sólo en la EA, sino también en otras enfermedades neurodegenerativas (Houeland *et al.*, 2010).

Otro factor potencialmente importante es la concentración de colesterol, cuya elevación podría aumentar la velocidad de depósito de las placas (Forti *et al.*, 2010; Querfurth y LaFerla, 2010). Por último, se están desvelando muchos paralelismos entre la EA y otras enfermedades neurodegenerativas progresivas que causan demencia, como las enfermedades de Parkinson, Huntington y las enfermedades por priones (Kell, 2010).

2.1.4. Tratamiento y estrategias terapéuticas

La implementación de un tratamiento médico se basa en las necesidades tanto del paciente como de los cuidadores o familiares. En primer lugar se intenta tratar el estado de ánimo del paciente para asimilar la enfermedad, y después, paliar las afectaciones de la función cognitiva. Más adelante se abordarán los trastornos del comportamiento y la motricidad.

El tratamiento clínico que se da a la EA no es exclusivamente farmacológico, sino que intervienen muchos otros aspectos. A nivel farmacológico ya hemos visto el uso de fármacos inhibidores de la acetilcolinesterasa como es el caso de la tacrina, el donecepilo y la rivastigmina (Fernández-Bachiller *et al.*, 2010), que se decantan básicamente hacia una actuación que potencie los sistemas de neurotransmisión afectados y deficitarios, como serían las vías colinérgicas. La actuación incide sobre la disponibilidad de acetilcolina, tanto facilitando la disposición del sustrato como bloqueando su degradación. Asimismo, el uso de la memantina, antagonista de los receptores NMDA para el glutamato, puede

ser un tratamiento más eficaz que los potenciadores de la acetilcolina mencionados, pero este fármaco tampoco impide que la enfermedad evolucione y siga su curso (Fernández-Teruel, 2008; Martínez-Coria, et al., 2010). El uso de neurolépticos del tipo haloperidol va enfocado al tratamiento de las conductas agresivas, y la utilización de benzodiazepinas o/y antidepresivos se dirige hacia la sintomatología ansiosa y afectiva (depresiva) que se asocia a la enfermedad.

Las estrategias terapéuticas modernas que se dirigen a la estabilización de la enfermedad, se centran en fármacos con capacidad de reducción o de eliminación de los depósitos de amiloide. Esto se ha conseguido a través de terapias inmunológicas (con anticuerpos que reducen la beta-amiloide, Billings *et al.*, 2005; Kitazawa *et al.*, 2009; Oddo *et al.*, 2004, 2006a; Schenk *et al.*, 1999), reforzando así la importancia de inhibir o reducir la formación y producción de β A en la EA.

También se están probando tratamientos preventivos con fármacos antidepresivos (especialmente de la familia de los ISRS), que retardan los depósitos de β A (Nelson *et al.*, 2007) y reducen el exceso de estrés crónico y de niveles de las hormonas relacionadas con el estrés (como los glucocorticoides –GCs–; excesos que se dan en trastornos como la depresión). Ya que el estrés crónico o/y el exceso prolongado de GCs, son potenciadores de la degeneración neuronal provocada por la activación glutamatérgica, que a su vez se hiperactiva en condiciones en que aparecen los síntomas neuropatológicos de la EA (exceso y deposición de β A), el hecho de que los antidepresivos ISRS retrasen la neuropatología EA en modelos de ratón transgénico parece prometedor, tanto como posible hallazgo clínico como por la vía de investigación que de ahí se deriva (ver p. ej. Fernández-Teruel, 2008; Nelson *et al.* 2007).

También se complementan estas estrategias con el uso de terapias preventivas basadas en dietas que incorporen determinados ácidos grasos

(Green et al., 2007) y pobres en colesterol, para modular el riesgo de la enfermedad (Refolo et al., 2000, 2001). Por otro lado, también parecen ser factores de protección el uso prolongado de fármacos antiinflamatorios o el consumo de estrógenos (Carroll et al., 2007; Fonseca et al., 2009; McKee et al., 2008; Rosario et al., 2006), así como el uso de potenciadores de los antioxidantes como la vitamina E y la seligilina (un inhibidor de la monoaminooxidasa) (Markesbery et al., 1999; Mattson, 2004).

Otro factor de protección a considerar sería el incremento del entrenamiento cognitivo, como sería el aspecto educativo, ya que se ha observado que los colectivos con más formación académica y nivel intelectual presentan una menor frecuencia de la enfermedad, posiblemente porque la estimulación intelectual incrementa el número de conexiones sinápticas, de manera que las neuronas afectadas se pueden sustituir con más facilidad o suplir la función (Rodríguez Álvarez et al., 2004; Wilson et al., 2002). Así como la realización de ejercicio físico (García et al., 2011).

2.2. MODELOS DE RATÓN PARA LA EA: ASPECTOS NEUROPATOLÓGICOS Y COGNITIVOS

Diversas disciplinas científicas se benefician del conocimiento derivado del uso de una amplia gama de procedimientos que comúnmente se agrupan bajo el término de “Modelos animales en Neuro-Psicopatología o/y Neuro-Psicofarmacología”. El uso de estos procedimientos o modelos ha resultado de enorme transcendencia y continúa siendo generalmente imprescindible para el progreso en todos aquellos ámbitos de la ciencia. Los modelos animales tienen por objetivo imitar tanto procesos psicológicos/conductuales normales como síntomas o síndromes psicopatológicos (y neuropatológicos) humanos, de forma que sea posible el estudio y la manipulación de los mecanismos psicológicos y neurobiológicos intervinientes en tales procesos, así como la evaluación de los efectos de posibles tratamientos (farmacológicos o no) (Fernández-Teruel et al., 2000, 2008; Tobeña y Fernández-Teruel, 2010).

A pesar de las importantes contribuciones de los modelos de ratón transgénico (como veremos a continuación) para el estudio de la enfermedad de Alzheimer, las limitaciones que presentan estos modelos son cada vez más evidentes y reconocidas. La mayoría de los modelos de ratón transgénico se crean con los genes que expresan mutaciones presentes en la EA familiar, una forma de la enfermedad que representa menos del 5% de los casos. A continuación, revisamos de forma resumida algunos de los modelos animales (en ratón) más relevantes, representativos y más utilizados para el estudio de la neuropatología y psicobiología de la Enfermedad de Alzheimer (ver tabla 2.1)

2.2.1. Modelos de ratón no transgénico

El modelo SAMP8

El ratón SAMP8 es un modelo con senescencia neural y cognitiva acelerada (Butterfield *et al.*, 2005; Nomura *et al.*, 1999; Okuma *et al.*, 1998), que se basa en la edad, en lugar de en mutaciones. Estos ratones muestran una notable relación entre la edad y el deterioro acelerado en el aprendizaje y la memoria. Una progresiva acumulación de daño oxidativo causa una disfunción de los sistemas de defensa contra el estrés oxidativo en estos ratones, lo que conlleva la aceleración del envejecimiento. Además del estrés oxidativo, los datos publicados muestran a los ratones SAMP8 como un modelo de envejecimiento que presentan además muchas características adicionales relacionada con el inicio de la neuropatogénesis de la EA, como alteraciones en el aumento de β A, hiperfosforilación de Tau y una disminución de los niveles cerebrales de acetilcolina (Woodruff-Pak, 2008).

Inyecciones intraventriculares de anticuerpos β A, en cerebro de ratones SAMP8 de 12 meses, aumentan significativamente tanto la capacidad de

aprendizaje y memoria como los niveles de la acetilcolina en hipocampo (Farr *et al.*, 2003).

2.2.2. Modelos de animales transgénicos para la EA

Los modelos animales son esenciales para el progreso de la investigación sobre una enfermedad. Aunque existen modelos animales naturales de la EA, como los primates envejecidos, la construcción de animales transgénicos supone una enorme ventaja, porque permite disponer de modelos más baratos de bajo coste y fácilmente reproducibles para la investigación de la fisiopatología y los tratamientos experimentales de la EA.

Los animales transgénicos son generalmente ratones, ratas o cobayas, a los que en las primeras fases del embrión se les introduce mediante inyección intranuclear un gen (o parte) del de otra especie, junto con una secuencia promotora de la expresión de este gen (Oddo *et al.*, 2003a). En el caso de la EA se han construido diferentes transgénicos para el gen de la APP humana (proteína precursora de la β -amiloide) normal o con alguna mutación relacionada con la EA, para el gen de la presenilina 1 y 2 (PS1 y PS2), e incluso para la proteína Tau. Además, mediante cruces entre animales transgénicos pueden producirse animales doblemente transgénicos, como sería el caso de animales portadores de las mutaciones para APP y presenilinas (Bizon *et al.*, 2007).

Un modelo alternativo al transgénico es el *knockout*, en el cual lo que se produce es una inhibición en la expresión del gen a examinar, lo que permite conocer la función de la proteína relacionada. Las primeras investigaciones para producir la patología de la EA en ratones transgénicos se basaron en la identificación del péptido β A en pacientes con la trisomía 21 (síndrome de Down) y después en las placas seniles de la EA (Masters *et al.*, 1985), centrándose en buscar la mutación responsable de los casos de la EA familiar. Se halló que no existía una única mutación, sino que varias mutaciones podían

ser capaces de causar la enfermedad, mutaciones que no necesariamente se localizaban en el gen de la APP (Chartier-Harlin *et al.*, 1991; Goate *et al.*, 1991) sino que también se encontraban en los genes de la presenilina 1 y 2 (Rogaev *et al.*, 1995; Sherrington *et al.*, 1995), que participan directamente en la producción de la β A.

Cuando se transfiere el gen de la APP en modelos celulares, generalmente se induce un incremento de la ratio $\beta A_{42}/\beta A_{40}$ (Borchelt *et al.*, 1996), ya que se induce una sobreproducción de la proteína, y este exceso de APP puede ser suficiente para incrementar la secreción del péptido β A. Sin embargo, generalmente, es necesario que esta APP esté mutada para que produzca una cantidad suficiente de β A y así pueda producir cambios visibles.

Las mutaciones del gen de la proteína Tau no están asociadas con la EA, pero sí con la demencia fronto-temporal. Por este motivo, es lógico considerar que la patogénesis de la EA está relacionada con un cambio en la APP y no en el metabolismo de Tau (Oddo *et al.*, 2007). Esta conclusión se formaliza con la vigente "hipótesis de la cascada amiloide", la cual establece que la acumulación del péptido β A es la causa de unas reacciones en cascada que conducen a la patología Tau y a la muerte neuronal (Hardy *et al.*, 1992; LaFerla *et al.*, 2005, 2007; Mattson, 2004).

2.2.2.1. Diversos modelos de animales transgénicos

Se han utilizado las tres isoformas de la APP humana (hAPP) (aminoácidos 695, 751, y 770) como transgenes. Las mutaciones del gen de la APP que se han utilizado, suelen nombrarse según el lugar donde han sido identificadas: Swedish (la cual está formada de dos mutaciones contiguas), London e Indiana (M671L, K670N y V717I, 717F, respectivamente). El gen hAPP es impulsado por diversos promotores -PDGF, thy-1 o thy-2 de ratón y PrP de Hamster-, los cuales permiten la expresión exclusiva o preferente en el sistema nervioso central. El simple aumento del nivel de APP en ratón no causa la deposición de

β A, por lo que es necesaria la transfección de la APP humana (diecisiete aminoácidos difieren entre el APP de ratón y el del humano para la evaluación de modelos de ratón transgénico para la EA) (Codita *et al.*, 2006; Duyckaerts *et al.*, 2008).

El éxito de estos modelos ha sido importante para la comprensión de los mecanismos de producción y deposición de β A, así como para el estudio de estrategias terapéuticas. Por ejemplo, copias de los genes humanos de APP y genes de la presenilina 1 y 2 implicados en la EA familiar son utilizados para crear modelos de ratón transgénico (Duff *et al.*, 1996; Hsiao *et al.*, 1996). En la tabla 2.1 se resumen las cepas de ratones transgénicos que han sido más estudiadas según la literatura.

2.2.2.2. Ratones transgénicos para APP

En estos modelos se ha encontrado un aumento de los niveles cerebrales de β A₄₂, formando depósitos de placas seniles. Algunos de ellos también muestran neuritis distróficas, pero hasta la fecha no se encuentran ovillos neurofibrilares. Además, en estos modelos, se encuentran las mismas lesiones oxidativas que en cerebro de humanos con EA. El resultado obtenido de la comparación de las diferentes cepas de ratón estudiadas, indica que la aparición y la gravedad de los depósitos de amiloide están directamente relacionadas con el nivel de péptido β A₄₂. Los modelos más utilizados son:

La cepa de ratón PDAPP.

Es la primera cepa de ratón con patología en acumulación del péptido β A. Se utilizó un cADN-minigen portador de la mutación Indiana (V717/F) para la secuencia de la hAPP. La expresión de la APP, se realiza a través del promotor PDGF- β (Games *et al.*, 1995). Esta línea de transgénicos PDAPP ha sido ampliamente estudiada, y se ha visto que, a la edad de seis meses, el ratón heterocigoto desarrolla depósitos extracelulares de péptido β A en el

hipocampo, y con 8 meses de edad los presenta en el cortex cerebral (Irizarry *et al.*, 1997a, 1997b).

La cepa de ratón Tg2576.

Este modelo sobreexpresa la isoforma 695 del hAPP con la doble mutación Swedish (K670N/M671L), bajo el control de la proteína promotora (prión) de hámster. A los 9-11 meses de edad, se encuentran depósitos de β A, así como de β A difusa localizada en hipocampo, en cortex cingulado y en otras aéreas corticales. En este modelo se han encontrado cambios conductuales y electrofisiológicos detectados previamente a la deposición de placa amiloidea (Hsiao *et al.*, 1996).

La cepa de ratón APP23

Este transgénico fue desarrollado por Novartis Pharma. La isoforma 751 del hAPP con la doble mutación Swedish, se expresa bajo el control de Thy-1-2 como promotor de ratón. En este modelo, a los 6 meses de edad, se observan depósitos del péptido β A difuso en parénquima y en los vasos. Además, el modelo presenta una pérdida neuronal de las células piramidales del área CA1 (Sturchler-Pierrat *et al.*, 1997).

La cepa de ratón C3-3.

Este transgénico también contiene una APP que lleva la doble mutación Swedish sobreexpresada. El quimérico APP ratón/humano con la mutación Swedish K670N/M671L contiene un dominio β A humanizado. El promotor es un prión-promotor de ratón. En este modelo, los ratones no desarrollan placas de amiloide hasta de 18 meses de edad (Borchelt *et al.*, 1996 , 1997).

La cepa de ratón Tg CRND8.

Este ratón lleva tanto la doble mutación Swedish como la mutación Indiana (hAPP695 K670N, M671L y V717F). Este modelo está diseñado para expresar las dos mutaciones de APP, bajo el control de un prión-promotor de hámster. El transgénico muestra una deposición de beta-amiloide acelerada y, además, las placas se desarrollan de manera temprana, hacia los 3 meses de edad (Chishti *et al.*, 2001). La alta concentración de βA y el aumento de la ratio entre $\beta A_{42}/\beta A_{40}$ explican por qué la patología en este modelo es particularmente agresiva.

La cepa de ratón APP Arc/Swe.

Este transgénico fue diseñado para centrarse en el estudio de los estadios de la patología previos a la deposición de la βA (Dong *et al.*, 2004, 2007). La formación de placa amiloide, es precedida por una fase de agregación βA intraneuronal intensa, que se inicia a los 4 meses de edad. Hacia los 9 meses, los ratones presentan deposiciones de amiloide en los núcleos del tálamo y en regiones del cerebro con una alta expresión del transgén, así como agregados intraneuronales generalizados.

2.2.2.3. Ratones transgénicos para Presenilina

Las mutaciones para PS1 o PS2, son características por inducir un aumento de los niveles de βA_{42} sin formación de placa (Oyama *et al.*, 1998; Qian *et al.*, 1998; Sawamura *et al.*, 2000). El deterioro conductual de este modelo es modesto (Lalonde *et al.*, 2003a, 2003b), sin embargo presenta alteraciones en la homeostasis del calcio en el retículo endoplasmático y, además, se ha demostrado que el transgén para la mutación PS1 humana altera el transporte axonal e incluso induce hiperfosforilación de Tau (Lazarov *et al.*, 2007). Los ratones *knockout* permiten evaluar la función de las proteínas no expresadas. En el caso de las presenilinas, lo que ocurre es que el modelo animal

(*knockout*) fallece en los primeros minutos de vida por malformaciones del desarrollo, lo que indica una función de esta proteína en la embriogénesis.

2.2.2.4. Ratones doble transgénicos para β APP y PS1

Este modelo muestra un rápido desarrollo de la formación de placas comparado con el modelo simple para PS1. A nivel conductual presenta alteración en tareas de aprendizaje espacial a la edad de 15 meses (Bizon *et al.*, 2007). Sin embargo, este modelo tiene sus limitaciones, ya que a pesar de ser un modelo para la amiloidosis, presenta poca pérdida neuronal así como poca formación de ovillos neurofibrilares.

2.2.2.5. Ratones transgénicos para ApoE

La apolipoproteína E (ApoE) es una proteína implicada en el transporte del colesterol. La sustitución del gen ApoE por el alelo humano $\epsilon 4$ se asocia con mayores depósitos de amiloide y con mayores cantidades de β -amiloide fibrilar que en el caso de la sustitución por el alelo $\epsilon 3$. Un modelo de ratón transgénico para APP, pero *knockout* para el gen ApoE, desarrolla menos depósitos de amiloide y de forma menos extensa, lo que apoya al papel de esta proteína en el depósito de amiloide (Bales *et al.*, 1999, 2002). Resultados similares fueron aportados por un modelo derivado de la línea de Tg2576 (Holtzman *et al.*, 2000). Los ratones carentes del gen ApoE murino, que expresan Apo $\epsilon 3$ humana, tienen una latencia más larga en el desarrollo de las placas y muestran una reducción de la carga de amiloide, en comparación con animales similares que expresan el gen Apo $\epsilon 4$ humano.

2.2.2.6. Ratones transgénicos para Tau

La proteína Tau es una fosfoproteína que pertenece a la familia de las proteínas asociadas a microtúbulos, que se une a la tubulina y facilita la polimerización del túbulo (Cleveland *et al.*, 1977). Las mutaciones del gen Tau,

son conocidos por ser la causa de la demencia frontotemporal ligada a cromosoma 17 (Götz *et al.*, 2008). Se observó que, ratones que expresan la proteína Tau humana normal no desarrollan la patología NFT, pero, una vez que se identificó la mutación en Tau, los estudios se orientaron hacia generar modelos adecuados de la patología Tau (Lewis *et al.*, 2000). Inicialmente, la producción de modelos de EA se veía afectada por la aparición de alteraciones motoras en ratones jóvenes, seguida de una muerte prematura. Después de encontrar construcciones genéticas adecuadas, se obtuvieron líneas de transgénicos sin patología motora (Götz *et al.*, 2001a). Se ha demostrado, en líneas de transgénicos Tau P301S y P301L (Götz *et al.*, 2001b; Allen *et al.*, 2002), que la exposición de determinadas proteínas Tau se correlaciona con la formación neurofibrilar, lo que sugiere que la agregación de Tau es causada por fosforilación anormal en lugares precisos.

Las similitudes de los aspectos morfológicos y de comportamiento entre fenotipos de ratones transgénicos para Tau, APP/presenilina y ApoE, indican una deficiencia clave en el transporte axonal (Wirhns *et al.*, 2006), que sugiere la idea de centrar el tratamiento de la EA en la prevención del desarrollo de dicha deficiencia (Götz *et al.*, 2006). La combinación de transgénicos con doble mutación para la APP y Tau produce ratones en los que hay lesiones semejantes a los ovillos neurofibrilares (Götz *et al.*, 2001a).

Tabla 2.1. Resumen de los modelos transgénicos más utilizados (extraído de Codita et al., 2006).

MODELO	BACKGROUND	PROMOTOR	TRANSGÉN	REFERENCIA
mutación APP				
PDAPP	Outbred Swiss-Webster crossed to (C57B6xDBA2)F1	PDGF- β chain gen	hAPP V717/F (Indiana mutation)	<i>Games et.al</i>
Tg2576(APP ₆₉₅ SWE)	Hybrid background: C57B/6J x SJL F2	Hamster PrP	hAPP 695 K670N/M671L (Swedish double mutation)	<i>Hsiao et.al</i> <i>Sturchier-</i>
Tg APP 23	Hybrid background: (C57B/6J x DBA2) x C57BL/6	Mouse Thy-1	hAPP 751 Swedish double mutation hAPP 695 V717/I	<i>Pierrat et.al</i>
APP Lo	FVB/N	Mouse Thy 1	(London)	<i>Moechars et.al</i>
Mutaciones combinadas APP				
Tg CRND 8	Hybrid background: (C3H/He x C57BL/6) x C57BL/6	Hamster PrP	hAPP 695 Swedish double mutation and Indiana	<i>Janus et.al</i> <i>Chishti et.al</i>
J20 (APP Swedish-Indiana)	Hybrid background: C57BL/6 x DBA/2 F1	PDGF- β chain gen	hAPP 695 Swedish double mutation and Indiana	<i>Mucke et.al</i>
Tg APPArcSwe	Hybrid background: C57BL/6 x CBA F1	Mouse Thy 1	hAPP Swedish double mutation and Artic	<i>Lord et.al</i>
Mutaciones Presenilina				
Human PS1 _{w1} rescue	Hybrid background: C57BL/6 x SJL	Mouse Thy 1	Human wild type PS1	<i>Qian et.al</i>
PS1 M146V	Swiss-Webster x (C57BL/6 x DBA/2) F1	Rat PDGF β chain	Human PS1 M146V	<i>Duff et.al</i>
Mutaciones APP y presenilina				
APP751 ^{SL} /PS1KI	Hybrid: C57BL/6 50% CBA 25% - 129SV 25%	Thy 1	hAPP Swedish and London hPS1 knockin M233T/L235P	<i>Casas et.al</i>
Mutaciones Tau				
Tau P301L	Hybrid: C57BL/6, DBA/2 Swiss-Webster	Mouse Thy 1.2	Human tau 40 with 4 repeats P301L mutation	<i>Gotz et.al</i>
Triple transgenic mice				
3xTg_AD	Hybrid background: 129/C57BL/6	Mouse Thy 1.2	hAPP Swedish mutation Tau P301L PS1 M146V	<i>Oddo et.al</i>

APP, amyloid precursor protein; PDGF- β , platelet derived growth factor β ; hAPP, human APP

2.2.3. El modelo triple transgénico (3xTgAD)

Los ratones transgénicos 3xTgAD fueron creados a partir de la microinyección de los transgenes de la APP_{Swe} y tau_{P301L} en el pronúcleo de una célula embrionaria de un ratón “*knock in*” para el gen de la PS1_{M146V} (Oddo *et al.*, 2003a). Se ha definido el desencadenante molecular del declive cognitivo en este modelo transgénico, que mimetiza varios marcadores críticos de la neuropatología de la EA (Billings *et al.*, 2005). De manera consistente con la hipótesis de la cascada amiloidea, las placas extracelulares de βA_{42} preceden a los ovillos neurofibrilares y ambos se desarrollan de manera secuencial y jerárquica en regiones cerebrales relevantes en la enfermedad (corteza, hipocampo y amígdala), con un curso temporal similar al del cerebro humano con EA (Billings *et al.*, 2005; Oddo *et al.*, 2003a) (ver resumen en Tabla 2.2).

Tabla 2.2 . Patrón temporal y neuroanatómico de las patologías βA y Tau en ratones 3xTgAD según Billings *et al.* (2005) y Oddo *et al.* (2003a).

Modelo animal 3xTg_AD						
	2 meses	3 meses	4 meses	6 meses	12 meses	15 meses
Corteza	∅	Inicio βA Intra-neuronal	βA intra-neuronal	βA intra-neuronal extendida; Inicio depósitos βA extracelular	Depósitos βA extracelulares extendidos	Depósitos βA extracelulares extendidos Ovillos de tau
Hipocampo	∅	∅	βA intra-neuronal	βA intra-neuronal	Depósitos βA extracelulares extendidos Ovillos de tau	Depósitos βA extracelulares extendidos Ovillos de tau

La inflamación cerebral también se desarrolla de manera relacionada con la edad y la microglia se co-localiza con las placas βA (Kitazawa *et al.*, 2005). La cuestión es que la disfunción en la plasticidad sináptica tiene lugar antes de la deposición de βA extracelular y de la formación de ovillos, y está asociada con

la inmunoreactividad temprana a la β A (LaFerla *et al.*, 2005; Oddo *et al.*, 2003a,b), sugiriendo así un nuevo papel patológico para la β A intraneuronal (LaFerla *et al.*, 2007). La investigación de la relación dinámica entre los niveles intracelulares y extracelulares de β A, propone que la acumulación intraneuronal de β A provoca la aparición de declives cognitivos, mientras que los procesos intracelulares y extracelular son responsables del agravamiento de la EA, como también ocurre en el modelo triple transgénico (Oddo *et al.*, 2006b).

Este hecho sugiere que la disfunción sináptica podría ser un defecto temprano en la patología de la EA, que precede la formación de placas y ovillos. Además, en estos animales 3xTgAD hay una pérdida selectiva (y dependiente de la edad) de receptores nicotínicos (α 7nAChRs) en hipocampo y córtex, que aparece a los 6 meses de edad, una reducción que correlaciona con el aumento intraneuronal de β A y está restringida a regiones cerebrales que muestran acumulación del mismo (Oddo *et al.*, 2005).

Como se ha mencionado antes, recientemente se han obtenido evidencias de la acumulación intraneuronal de β A como un acontecimiento temprano en humanos con Alzheimer, que podría ser un marcador del inicio de los síntomas de la demencia (Tseng *et al.*, 2004). In vitro, se ha observado la neurotoxicidad de la isoforma β A₄₂ micro-inyectada (Zhang *et al.*, 2002), la inmuno-reactividad a la β A₄₂ dentro de neuronas que estaban próximas a (o dentro de) placas extracelulares, así como también dentro de neuronas piramidales del hipocampo, en individuos con diagnóstico clínico que va desde el deterioro cognitivo leve (MCI o "*Mild Cognitive Impairment*") a deterioro cognitivo severo (Gouras *et al.*, 2000). De manera similar, las acumulaciones intraneuronales de β A se han descrito en cerebro de personas con síndrome de Down (Mori *et al.*, 2002), y preceden al desarrollo de las placas amiloideas (Gyure *et al.*, 2001).

De manera consistente con la hipótesis de la cascada β A, la cual propone la acumulación de esta proteína como el desencadenante de todos los tipos de

EA, en este modelo triple transgénico la deposición de β A se inicia meses antes que la patología Tau, y los niveles de expresión de los transgenes APP y Tau son comparables (Oddo *et al.*, 2003b, ver tabla 2.2). A pesar de que las patologías β A y Tau se inician en regiones cerebrales diferentes, se piensa que los depósitos de β A podrían alterar el metabolismo celular, dando lugar a cambios conformacionales y de fosforilación de la Tau, y consecuentemente al inicio de la patología (Morrissette *et al.*, 2009; Querfurth *et al.*, 2010).

Los depósitos de β A aparecen inicialmente en regiones corticales, se inician en la corteza frontal (predominante a las capas 4 y 5), después se extienden hacia regiones corticales posteriores como la corteza occipital y parietal, y con la edad progresan hacia áreas límbicas como el hipocampo y la amígdala. Las regiones hipocampales del subículum y CA1 se ven particularmente afectadas, y en los ratones 3xTgAD más envejecidos también se ha encontrado que tanto la región CA3 como en el giro dentado contienen extensos depósitos de β A (Oddo *et al.*, 2003a; Billings *et al.*, 2005).

Mientras que a los 3 meses de edad la inmuno-reactividad a la β A intraneuronal es detectable con el anticuerpo específico anti- β A₄₂ únicamente en corteza cerebral, los depósitos extracelulares de β A no empiezan a aparecer de forma difusa hasta los 6 meses de edad, momentos en que la β A intraneuronal ya está ampliamente extendida en la misma región (Oddo *et al.*, 2003a, 2003b). A esta edad, en hipocampo ya se puede detectar la acumulación intraneuronal de β A, pero los depósitos no aparecen hasta edades más avanzadas. Por otra parte, los déficits sinápticos (presentes a los 3 meses de edad) se manifiestan meses antes de que haya detección de agregados de β A y correlacionan con la sobre-expresión de APP (más concretamente con la acumulación intraneuronal de β A)(Oddo *et al.*, 2003b). Un hallazgo interesante es el hecho de que la inmuno-reactividad decrece entre los 9 y 12 meses de edad (Oddo *et al.*, 2006a).

Con respecto a la patología Tau, los agregados aparecen inicialmente en el hipocampo, y con el envejecimiento del animal progresan hacia regiones corticales. Para detectar los cambios en la conformación de la proteína, un requisito para la formación de los ovillos, se ha utilizado el anticuerpo MC1 (y la AT8, que reconoce la tau fosforilada en la serina 202 y threonina 205), y se ha visto que los ovillos intraneuronales de Tau hiperfosforilada no aparecen hasta los 12 meses de edad a la región CA1 del hipocampo, extendiéndose progresivamente hacia regiones corticales del ratón envejecido. Cabe tener en cuenta que es probable que las alteraciones de la Tau afecten también a la plasticidad sináptica en ratones envejecidos (Medeiros *et al.*, 2010; Oddo *et al.*, 2003b).

Como se ha comentado previamente, el modelo 3xTgAD manifiesta disfunción sináptica, incluyendo déficits de LTP (*long term potentiation*), de manera dependiente de la edad y previa a la formación de placas de β A y de los ovillos neurofibrilares (Morrissette *et al.*, 2009; Oddo *et al.*, 2003a; Querfurth *et al.*, 2010). Por tanto, el fenotipo conductual también se ve alterado en edades tempranas, previas a la detección de placas (p. ej. Billings *et al.* 2005).

Se ha demostrado que un determinado anticuerpo de β A, administrado como una única inyección en hipocampo, puede reducir los depósitos de β A y también conducir a la limpieza de la patología Tau (Oddo *et al.*, 2004). Este resultado sugiere que detener la oligomerización de la β A es uno de los posibles objetivos para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, siempre que se detenga o reduzca la progresión de la patología Tau (Oddo *et al.*, 2004 y 2006b).

2.2.3.1. Animales 3xTgAD a los 4 meses de edad

Como ya hemos mencionado anteriormente, los ratones 3xTgAD de 4 meses de edad (que forman parte del presente trabajo), presentan disfunción sináptica, incluyendo déficits en la potenciación a largo plazo (*long-term*

potentiation o LTP en inglés), que se manifiestan antes de la detección de los agregados de β A y correlacionan con la acumulación de β A a nivel intraneuronal, sugiriendo un nuevo papel patogénico de la β A en relación a la plasticidad sináptica (Billings *et al.*, 2005; Garcia *et al.*, 2011; LaFerla *et al.*, 2005, 2010; Oddo *et al.*, 2003a). Asimismo muestran una disminución de la neurogénesis, relacionando así este efecto con el empeoramiento cognitivo que presentan los animales a esta edad (Blanchard *et al.*, 2010; Rodriguez *et al.*, 2008).

También se ha observado, a esta edad de 4 meses, una pérdida temprana de neuronas de la capa III de la corteza somatosensorial (Bittner *et al.*, 2010), elevados niveles de estrés oxidativo (implicado en la toxicidad inducida por la β A; Resende *et al.*, 2008) y un aumento de los niveles de ácido homocisteico (HA) en hipocampo que se relacionan con la acumulación intraneuronal del péptido β A (Hasegawa *et al.*, 2010). En cambio no se han encontrado diferencias de la enzima colina acetiltransferasa (ChAT) en hipocampo de animales 3xTgAD de 4 meses de edad (Perez *et al.*, 2010). Algunos estudios incluso han observado un adelanto en el patrón temporal de la neuropatología presentada por Oddo *et al.* (2003a), detectando depósitos de β A a nivel intraneuronal en hipocampo a los 2 meses de edad (Rodriguez *et al.*, 2008), así como presencia de Tau fosforilada en neuronas de la amígdala basolateral (BLA) en animales 3xTgAD de 6 meses (España *et al.*, 2010).

Respecto a los animales 3xTgAD (de 4 meses de edad) que forman parte del presente estudio, se ha detectado presencia de β A a nivel intraneuronal en la capa 1 (CA1) del hipocampo (Vivó *et al.*, 2006; ver Figura 6.1 en la Discusión general), confirmando así los resultados obtenidos por el laboratorio de origen (Billings *et al.*, 2005; Oddo *et al.*, 2003a).

Incluso se ha observado que estos animales presentan un aumento de los receptores de Galanina (GAL) en hipotálamo (HT) y una reducción de receptores muscarínicos (M1) en amígdala posterior (Manuel *et al.*, 2007). Las

interacciones de la GAL con la neurotransmisión glutamatérgica (Kinney *et al.*, 1998) y colinérgica (Mitsukawa *et al.*, 2008; Ögren *et al.*, 2010) centrales, se asocian con el declive cognitivo de la EA, empeorando así la memoria espacial en roedores (Counts *et al.*, 2008). La GAL ejerce también una modulación sobre la transmisión serotoninérgica en amígdala e hipocampo (Hökfelt *et al.*, 1998; Yoshitake *et al.*, 2003), así como una influencia excitatoria sobre la liberación mesolímbica de dopamina (Ericson *et al.*, 1999). Así que, podemos decir que la GAL actúa a través de varios substratos, convirtiéndose así en un objeto de estudio futuro interesante en el modelo de ratón 3xTgAD.

2.3. SÍNTOMAS NO COGNITIVOS EN LA EA Y SU MODELAJE EN RATONES TRANSGÉNICOS

2.3.1. Los Síntomas conductuales y psicológicos de la Demencia

A pesar de que los síntomas cognitivos son los que caracterizan la EA, los síntomas no cognitivos están adquiriendo cada día más importancia por su prevalencia y las disfunciones que generan (Blennow *et al.*, 2006; Lanari *et al.*, 2006). Sin embargo, a pesar de su origen común, basado presuntamente en la degeneración neuronal, los síntomas cognitivos tienen un perfil diferente del resto de síntomas neuropsiquiátricos no cognitivos, como los afectivos, los relacionados con la agresividad, y otros. Los síntomas neuropsiquiátricos a los que nos referimos se asocian a alteraciones en las funciones ejecutivas, pero son independientes de otros trastornos cognitivos como la alteración de memoria, lenguaje y habilidades visuo-espaciales (Shinosaki *et al.*, 2000). En la investigación de la Enfermedad de Alzheimer, estos síntomas (no cognitivos) se describen como “síntomas conductuales y psicológicos de la demencia” (SCPD; o, en inglés, BPSD –*Behavioral and Psychological Symptoms of Dementia*-), los cuales incluyen la conducta motora anormal, la depresión o ansiedad y las alteraciones de la personalidad, como la agresividad y la

irritabilidad. Este término –SCPD o “BPSD”- fue propuesto por la “*International Psychogeriatric Association*” en 1996, y engloba asimismo las alteraciones de la percepción (síntomas psicóticos), del contenido del pensamiento, del estado de ánimo y de la conducta en las demencias. La gravedad y la carga asistencial que comportan tales síntomas (Finkel *et al.*, 2003) puede contribuir a la institucionalización del paciente (Assal *et al.*, 2002), lo que ha llevado a considerar las terapias para los SCPD tan importantes como las terapias para la disfunción cognitiva en la EA (Lanari *et al.*, 2006).

En las fases iniciales de la patología de la EA, los trastornos más comunes son del orden afectivo como la apatía, la irritabilidad y la depresión, pero en las fases más avanzadas pueden aparecer trastornos o síntomas psicóticos como las alucinaciones y los delirios, así como cambios marcados en la personalidad. Según Reisberg *et al.* (1987), en la práctica clínica, los SCPD se pueden evaluar a través de escalas de valoración de la conducta como la “Behave-AD”, que distingue entre siete grupos de comportamiento: trastorno paranoide y delirante, alucinaciones, perturbaciones de la actividad, agresividad, trastornos del ritmo diurno, trastornos afectivos, ansiedad/fobias.

Un estudio reciente (Vilalta-Franch *et al.*, 2010) divide estos síntomas no cognitivos –SCPD- en tres grupos o factores: el factor “psicosis” (delirios, alucinaciones y conducta motora aberrante), el factor “depresivo” (depresión, ansiedad, irritabilidad, agitación, y apatía) y un tercero como factor “hipomanía” (euforia y desinhibición). Existe una correlación significativa entre la gravedad del deterioro cognitivo en la demencia y la frecuencia de los SCPD en general (Agniel *et al.*, 1990; Jeste *et al.*, 1992).

Los cambios de personalidad más frecuentes son la apatía y el abandono de actividades (Bozzola *et al.*, 1992), además de un deterioro en el control emocional y pérdida de interés por los sentimientos de los demás (Rubin *et al.*, 1987). Dependiendo de los estudios concretos, la depresión se encuentra entre un 5,1 a 38,1% de los pacientes, y los síntomas psicóticos entre el 11,7 y el

70%. La existencia de agitación se sitúa entre el 11 y el 56% de los casos (ver también Cummings *et al.*, 1997).

La agitación motora, las alucinaciones y el insomnio se han observado con mayor frecuencia en fases avanzadas de la EA (Ballard *et al.*, 2009; Eisdorfer *et al.*, 1992). A pesar de que el 41.8% de los pacientes con EA presentan alteraciones del sueño, son escasos los pacientes con insomnio nocturno superior a las dos horas (Cummings *et al.*, 1997). Los pacientes sufren un sueño fragmentado, con una mayor actividad nocturna (Volicer *et al.*, 2001), que se asocia con un aumento del letargo durante las horas del día (Onen *et al.*, 2003). La pérdida de peso es otro síntoma común adicional, presente en más del 50% de los pacientes con EA, a pesar de que la mayoría consumen más calorías al día por kilogramo de peso corporal que pacientes controles no dementes. Se ha estudiado la relación entre pérdida de peso y síntomas de comportamiento o SCPD (White *et al.*, 2004), observándose una correlación negativa entre el índice de masa corporal (IMC) y la agitación/agresividad, depresión, irritabilidad, conducta motora aberrante y el apetito. La pérdida de peso aumenta con la severidad y la progresión de la enfermedad, sugiriendo que dicha variable puede ser predictiva de mortalidad (White *et al.*, 1998).

En una encuesta realizada a familiares con demencia senil, se halló que en el 75% de los casos, la familia consideraba la agitación como el principal problema de la demencia (Tomonaga *et al.*, 1982). De ahí que haya adquirido especial y creciente importancia el considerar e intentar tratar las diversas manifestaciones de la demencia, tales como la agitación. Siguiendo un análisis factorial de los síntomas de agitación observados en una población de pacientes institucionalizados, los síntomas de agitación se dividieron en tres categorías principales: conducta agresiva (golpear, patear, empujar, arañar, tirar, agresiones verbales, agarrar, escupir, morder), comportamiento inapropiado no agresivo (andar, vestirse o desvestirse, cambiar de sitio, manejo inapropiado de objetos, manierismos repetidos como palmotear o frotar manos) y agitación verbal (quejas, requerimientos continuos de atención,

negativismo, gimoteo). Esta clasificación tiene interés por ser útil a los clínicos para la elección del tratamiento (o tratamientos) más apropiado (Rockewll, 1994).

La causa de la agitación observada en la demencia es desconocida. Sin embargo, los factores ambientales y biológicos tienen un papel muy importante en el inicio y en el mantenimiento de estas conductas en los pacientes con demencia (Ballard *et al.*, 2009; Cummings 2003). Posiblemente cada tipo de manifestación de agitación aparezca por una interacción diferente de factores ambientales y biológicos. La base biológica de la agitación de los pacientes con demencia se explica porque las estructuras relacionadas con el control de la agresividad, como amígdala, el hipocampo y núcleos septales, están afectadas de forma precoz y severa en la EA (Lanari *et al.*, 2006). Estas regiones tienen una inervación rica en neurotransmisores monoaminérgicos, acetilcolina y neuropéptidos. Existen datos bioquímicos indicativos de un deterioro del sistema serotoninérgico en pacientes con EA. Además, estudios neuropatológicos han encontrado lesiones, como ovillos neuro-fibrilares, en los núcleos del rafe, principal fuente serotoninérgica ascendente. La disminución de la función serotoninérgica central ha sido implicada en la génesis de conductas agresivas e impulsivas, tanto en animales como en el hombre (Borroni *et al.*, 2010; Frankle *et al.*, 2005). Además, existe una alta correlación entre diversos marcadores serotoninérgicos como la 5-HT en líquido cefalorraquídeo, o en sangre y la conducta agresiva. El descenso en los marcadores adrenérgicos (norepinefrina y dopamina) también se ha correlacionado experimentalmente con un descenso en la conducta agresiva (Lanari *et al.*, 2006).

Como acabamos de esbozar, los SCPD se abordan actualmente con fármacos como los antidepresivos (especialmente pro-serotoninérgicos, ISRS), los antipsicóticos y los ansiolíticos/sedantes (Cummings, 2003; Lanari *et al.*, 2006; Martín Carrasco, 2004; Martínez Lage *et al.*, 2001), pero la búsqueda de nuevos tratamientos farmacológicos y no farmacológicos es intensa. Mientras

que los tratamientos con inhibidores de la colinesterasa (por ejemplo, donecepilo) y un antagonista de los receptores N-metil-D-aspartato (memantina) para el deterioro cognitivo en pacientes con EA suelen ser eficaces en retrasar dicho deterioro (Repantis *et al.*, 2010), los antipsicóticos utilizados para tratar los SCPD pueden tener importantes efectos colaterales. Una señal de alarma es que la mortalidad en pacientes con demencia se incrementó mediante el uso de antipsicóticos atípicos, e incluso el uso de antipsicóticos convencionales parece conllevar un riesgo similar (Wang *et al.*, 2005).

El Yokukansan (TJ-54), una medicina tradicional japonesa que se ha utilizado para el tratamiento de las neurosis, insomnio e irritabilidad en los niños, mejora los SCPD como la agitación/agresividad e irritabilidad en pacientes con demencia sin graves efectos adversos (Iwasaki *et al.*, 2005). Esta terapia se ha estudiado en un modelo de ratón (Tg2576) para la EA, y los autores sugieren la posibilidad de que el TJ-54 podría ser una medicina útil en la gestión de los SCPD en pacientes con demencia (Egashira *et al.*, 2008, Tabuchi *et al.*, 2009).

2.3.2. Los SCPD en modelos de ratón para la EA

Para que los estudios con modelos animales puedan contribuir a la comprensión y el tratamiento de la EA, es importante que estos modelos presenten síntomas específicos de la enfermedad (Chadman *et al.*, 2009; Higgins *et al.*, 2003). El modelo múnido ideal debería desarrollar patología neural, cognitiva, conductual (SCPD) y neuroendocrina similar a la observada en pacientes humanos con EA. Aunque es claro que la mayoría de los estudios que utilizan modelos de ratones transgénicos para la EA se centran en los cambios moleculares y neuropatológicos de la enfermedad y en los déficits cognitivos (p.ej. Ambrée *et al.*, 2006; Garcia *et al.*, 2011; Giménez-Llort *et al.*, 2007, 2010; Higgins *et al.*, 2003; Vloeberghs *et al.*, 2004), se ha empezado ya a prestar atención sistemática a los otros síntomas –SCPD- de la EA con modelos animales. Así lo evidencian trabajos con ratones transgénicos para la

EA en los que se evalúan, por ejemplo, la conducta exploratoria y la actividad motora, la ansiedad (p. ej. Arendash *et al.*, 2001; Gimenez-Llort *et al.*, 2007, 2010; Lalonde *et al.*, 2002, 2003a y b), los niveles de glucocorticoides y función del eje HPA (Green *et al.*, 2006; Pedersen *et al.*, 1999; Touma *et al.*, 2004a) y los patrones de sueño-vigilia (Ambrée *et al.*, 2006; Huitron *et al.* 2002; Sterniczuk *et al.*, 2010a; Vloeberghs *et al.* 2004).

A continuación, y sin ánimo de ser exhaustivos, revisaremos algunos de los principales hallazgos obtenidos en estudios con diferentes modelos de ratón transgénico respecto a esos otros tipos de síntomas –SCPD- no esencialmente cognitivos, trabajos que son una muestra de cómo el interés científico se centra progresivamente en modelar con animales esos otros aspectos o síntomas de la EA.

En los ratones con la mutación APP23-Swedish aparecen alteraciones de los patrones de actividad, que emergen mucho antes de que las placas amiloides pueden ser detectadas en cerebro (Van Dam *et al.*, 2003). De manera similar, los ratones TgCRND8 (otro modelo transgénico de APP para la EA) presentan alteraciones en los patrones de actividad espontánea circadiana, con un incremento de actividad global y de las estereotipias, esto último correlacionado con elevadas concentraciones de corticosterona (Ambrée *et al.*, 2006) e hiperactividad del eje HPA (Touma *et al.*, 2004b). No obstante, este modelo transgénico no presenta diferencias en niveles de ansiedad respecto a los ratones control (Touma *et al.*, 2004b). En cualquier caso, también en este modelo (TgCRND8) las alteraciones SCPD mencionadas (esto es, los ritmos circadianos de actividad y estereotipias) aparecen en etapas previas a la detección de depósitos de amiloide (Ambrée *et al.*, 2006).

En el ratón transgénico Tg2576, que expresa la forma humana de APP_{695SWE} (Hsiao *et al.*, 1996), se ha observado que, aparte de presentar la disfunción cognitiva esperable, se caracteriza por su hiperactividad, conducta desinhibida y comportamiento impulsivo (Adriani *et al.*, 2006; Dong *et al.*, 2005; Lalonde *et al.*, 2003; Ognibene *et al.*, 2005; Stackman *et al.*, 2003). Estos hallazgos

sugieren que estos ratones transgénicos son una herramienta valiosa para el desarrollo de nuevos medicamentos para la demencia y los SCPD (Tabuchi *et al.*, 2009).

Alteraciones en la actividad circadiana basal, en forma de incrementos o disminuciones en función del estudio particular, de la fase del ciclo (a lo largo de las 24 horas) y de la edad o sexo de los animales, han aparecido también en estudios con el modelo de ratón (para la EA) triple transgénico 3xTgAD, que, por otra parte, generalmente presenta inhibición conductual (petrificación conductual, interpretable como ansiedad o miedo) incrementada ante situaciones de novedad o tests típicos de ansiedad, así como una función del eje HPA (p. ej. niveles de corticosterona circulante) incrementada progresivamente con la edad (ver p. ej. España *et al.*, 2010; García *et al.*, 2011; Giménez-Llort *et al.*, 2006, 2007, 2008, 2010; Green *et al.*, 2006; Sterniczuk *et al.*, 2010a,b; y refs. en esos trabajos). Con el mencionado modelo de ratón 3xTgAD, no obstante, el sentido de las diferencias conductuales respecto a los animales control presenta un cierto nivel de controversia dependiendo de los estudios y factores mencionados arriba. Puesto que este modelo de ratón para la EA es objeto de la presente tesis doctoral, discutiremos en mayor profundidad todos los resultados relevantes de la literatura en la sección de “Discusión” (ver apartados 4.3, 5.3 y 6 “Discusión General”) de los estudios que aquí presentaremos.

2.4. INFLUENCIA DE LOS FACTORES AMBIENTALES EN LA EA.

2.4.1. El estrés y la progresión de la EA.

Además del conocimiento de la contribución genética en la aparición y desarrollo de la EA y de otras demencias, es importante estudiar el papel que pueden desempeñar otros factores, tales como aspectos relacionados con el ambiente, experiencia/educación o el estrés a lo largo de la vida de los individuos (Sapolsky *et al.*, 1992, 2003). Evidencias epidemiológicas refuerzan, por ejemplo, el papel del estrés como factor de riesgo para la EA, ya que se ha observado que los ancianos propensos a la angustia psicológica tienen más probabilidades de desarrollar el trastorno que individuos no estresados a la misma edad (Wilson *et al.*, 2005, 2006). También se ha observado que, aunque los pacientes con EA presentan niveles elevados de cortisol basal, las disfunciones del eje HPA (ver más abajo) sólo parecen relevantes en etapas iniciales de la enfermedad (Swanwick *et al.*, 1998), ya que las disfunciones del eje HPA no empeoran con el deterioro cognitivo en fases más avanzadas. Además, resultados más recientes muestran que los niveles de cortisol en pacientes con EA son un reflejo de la presencia del alelo ApoE4 (Peskind *et al.*, 2001), sugiriendo que la función de la ApoE está influyendo en los niveles circulantes de dicha hormona. Todas estas evidencias han llevado a sugerir que el estrés (especialmente si es crónico) puede ser un inductor de reacciones o procesos psico-neurobiológicos, y en particular hormonales, que pueden afectar negativamente la supervivencia neuronal (Sapolsky *et al.*, 2003; Stein-Behrens *et al.*, 1994), especialmente de células nerviosas situadas en áreas directamente implicadas en procesos cognitivos (Rodrigues *et al.*, 2009; Sapolsky *et al.*, 1993; Sorrells *et al.*, 2009).

La respuesta del estrés es una reacción del cerebro y del organismo ante situaciones que amenazan su homeostasis. Así cuando los organismos perciben algún estímulo de amenaza, se inician una serie de reacciones con el

objetivo de movilizar las reservas energéticas hacia los tejidos que las pueden necesitar (como sería la musculatura, el sistema cardiovascular o el SNC), al mismo tiempo que se paralizan otros procesos hasta que la situación crítica se normalice. El sistema nervioso autónomo, y en particular la activación del sistema simpático, es crucial para las respuestas más rápidas (huída, lucha, incremento del consumo de glucosa, etc) ante la situación amenazante. Por otra parte, en el sistema endocrino se activan toda una serie de reacciones en cadena, que implican la síntesis y liberación de varias hormonas en diversas áreas cerebrales (en hipotálamo y en hipófisis, esencialmente) y en algunas regiones periféricas, como las glándulas adrenales (Armario, 2006; Sandi *et al.*, 2001). La secuencia principal consiste en la activación del llamado eje hipotalámico-pituitario-adrenal (eje HPA). De manera general podríamos decir que la señal de alerta inicial hace que el hipotálamo sintetice la hormona liberadora de corticotropina (CRF), la cual produce en la hipófisis la liberación de la hormona adrenocorticotropa (ACTH) al torrente sanguíneo. Cuando la ACTH llega a las glándulas adrenales situadas sobre los riñones, éstas inician la secreción de los corticosteroides o glucocorticoides. Los más característicos son la corticosterona en rata/ratón y el cortisol en monos y humanos. Ya en el torrente sanguíneo, los corticosteroides son transportados a los órganos periféricos y al cerebro, donde actuarán sobre diversas estructuras. Una de estas estructuras es el hipocampo, especialmente relevante para los procesos neurales que posibilitan el aprendizaje y la memoria (Martí y Armario 1998; Sandi *et al.*, 2001; Sapolsky *et al.*, 1992).

Existe una amplia evidencia experimental que muestra que la exposición prolongada a los corticosteroides tiene efectos nocivos que conducen a la muerte neuronal y al aumento de reactividad glial en el hipocampo (dos procesos característicos del envejecimiento), además de producir una disminución en la capacidad de las neuronas hipocámpicas para enfrentarse a agentes tóxicos o manipulaciones/accidentes traumáticas/os que producen degeneración neural, como la hipoxia-isquemia o las convulsiones excitotóxicas (Rodrigues *et al.*, 2009; Sapolsky, 1986, 1993; Sorrells *et al.*,

2009). Esto ha llevado a pensar que la elevación prolongada de los niveles de aquellas hormonas podría acelerar la pérdida neuronal durante el envejecimiento y aumentar la severidad de los déficits neurológicos inducidos por agentes tóxicos (Sapolsky *et al.*, 1990). En un estudio clínico realizado en humanos, en que se evaluó el efecto de la prednisona (un glucocorticoide con propiedades antiinflamatorias), se halló que esta sustancia podía llegar a acelerar el deterioro cognitivo en pacientes con EA en las primeras etapas de la enfermedad, en comparación con el grupo placebo (Aisen, 2000).

Además, algunos estudios con animales proponen una interacción entre los glucocorticoides y las neuropatologías características de la EA, como la acumulación de amiloide y los ovillos neurofibrilares (Budasz *et al.*, 1999; Clinton *et al.*, 2007; Elliott *et al.*, 1993; Green *et al.*, 2006). Estos hallazgos sugieren que los altos niveles de glucocorticoides, que se encuentran en la EA, no son simplemente una consecuencia del proceso de la enfermedad, sino que desempeñan un papel relevante en el desarrollo y la progresión de la misma. Así que, si estas hormonas del estrés pueden agravar la progresión de la EA, tanto la reducción del estrés como ciertos medicamentos deberían poder ralentizarla. En este sentido, en un estudio con los ratones 3xTgAD se halló que cuando animales jóvenes (4 meses de edad) eran inyectados con dexametasona, un glucocorticoide sintético similar a la corticosterona, los niveles de la proteína β -amiloide en el cerebro de los ratones aumentaban un 60 por ciento (Green *et al.*, 2006). También se observó que los niveles de la proteína Tau estaban aumentados, lo que demuestra la consecuencia de la exposición excesiva a glucocorticoides al menos en un organismo y un cerebro con predisposición genética a la sintomatología de EA, como es el modelo de ratón 3xTgAD. Cuando se administró dexametasona en animales 3xTgAD de 13 meses de edad (adultos que ya muestran neuropatología), la hormona de nuevo empeoró considerablemente las lesiones en el cerebro, dando lugar a una mayor formación de placa amiloidea y acumulación de la proteína Tau. Los investigadores descubrieron, asimismo, que los niveles más altos de beta-amiloide y Tau llevan a un aumento en los niveles de hormonas del estrés,

produciendo un efecto bucle (o de retroalimentación positiva; Clinton *et al.*, 2007; Green *et al.*, 2006).

Los estudios anteriores sugieren que, intervenir tanto en el control del estrés como en la reducción de los glucocorticoides, podría ser una buena estrategia terapéutica para la EA. En relación con esto, revisaremos a continuación evidencias de los efectos protectores frente al estrés que ciertos tratamientos de estimulación infantil producen en roedores, y que conllevan asimismo efectos neuroprotectores a largo plazo (Escorihuela *et al.*, 1994b; Fernández-Teruel *et al.*, 1997, 2002; González *et al.*, 1994; Meaney *et al.*, 1988, 1991; Núñez *et al.*, 1996; Sapolsky *et al.*, 1992).

2.4.2. La Estimulación Postnatal

De forma muy genérica, el desarrollo cerebral, proceso dinámico que se inicia en ya en las primeras semanas de la gestación, está influenciado por dos grandes tipos de factores: (1) los factores genéticos, que marcarán de forma decisiva la dirección en que debe movilizarse todo el potencial celular y deciden, hasta cierto punto, el nivel cuantitativo al que debe de llegar el grado de desarrollo; y, (2) los factores ambientales que, desde estadios embrionarios y con influencia creciente según avanza el desarrollo del cerebro, modulan y condicionan la cualidad y la intensidad del desarrollo. Es generalmente asumido que ambos tipos de factores no actúan de forma independiente y aditiva, sino continuamente en interacción (p. ej. Escorihuela *et al.*, 1994b).

Charles Darwin, en 1859, fue pionero en observar la importancia del ambiente en el desarrollo cerebral, al señalar que los cerebros de los conejos domésticos eran de menor tamaño que el de los conejos salvajes, postulando que las diferencias podrían atribuirse al confinamiento y al empobrecimiento de estimulación ambiental de los animales de granja durante generaciones. Afirmaciones en similar dirección, relativas a que las neuronas presentarían mayor número de sinapsis en los cerebros más estimulados, se deben a

Santiago Ramón y Cajal en 1894 (ver Escorihuela *et al.*, 1994b). Es decir, las intuiciones (más o menos empíricas) sobre la plasticidad del cerebro durante el desarrollo, y sobre su sensibilidad a los factores ambientales, ya existían entre los científicos en el siglo XIX. Las demostraciones experimentales y controladas de lo anterior, no obstante, se iniciaron a mediados del siglo pasado, mediante la administración de diferentes tipos estimulación infantil y/o juvenil a ratas de laboratorio que después eran evaluadas en tareas cognitivas, de reactividad emocional, así como a nivel neuroanatómico o neuroendocrino (p. ej. Hebb, 1947; Levine 1956, 1962; Levine *et al.*, 1956, 1957; Rosenzweig *et al.*, 1962; ver revisión de Escorihuela *et al.*, 1994b).

A estos trabajos pioneros debemos, en gran parte, el conocimiento actual de que la exposición a diferentes niveles de estrés o/y de estimulación ambiental durante el período postnatal o infantil/adolescente (e incluso en periodos posteriores del desarrollo cerebral), puede alterar perdurablemente (incluso permanentemente, en ciertos casos) procesos neuroendocrinos, índices de función y plasticidad neural, así como multitud de aspectos “temperamentales”/conductuales, incluidas las funciones cognitivas.

Más directamente relacionado con los objetivos del presente trabajo, fue Levine, en 1956 (Levine *et al.*, 1956) quien descubrió y evaluó sistemáticamente los efectos a largo plazo de un tipo particular de estimulación postnatal en ratas. Las características generales (resumiendo los procedimientos más utilizados en la literatura) de esta “estimulación postnatal” (EP) consisten en separar las crías de las madres y situarlas en compartimentos individuales por periodos de tiempo que oscilan entre 3 y 15 minutos (dependiendo del estudio/laboratorio), diariamente, durante las primeras 2-3 semanas de vida. Toda la manipulación de las crías (al separarlas de la madre y al devolvérselas) se realiza con las manos del investigador, con extremo cuidado y suavidad, y, algunos trabajos incluso acarician las crías una a una durante periodos de 3-5 segundos mientras están separadas de la madre (p. ej. ver revisión de Escorihuela *et al.*, 1994b).

La razón de que la separación maternal sea óptima durante 15 minutos diarios, se ha comprendido bastante después de los estudios de Levine, pues varios autores han demostrado que la separación maternal diaria más prolongada (de 1 hora o superior) produce mayores aumentos de las hormonas ACTH y corticosterona en las crías (indicadores de que éstas están recibiendo niveles superiores de estrés), efecto que a su vez se asocia a consecuencias conductuales negativas a largo plazo (Aisa et al., 2008; Macri et al., 2008; Millstein y Holmes, 2007; Parfitt et al., 2007; Pryce et al., 2003, 2005). En cambio, ya desde los trabajos iniciales de Levine (Levine et al., 1956, 1957), se sabe que períodos cortos de separación maternal (por ejemplo, de 15 minutos o inferiores), como sería el caso de la EP utilizada en el presente trabajo, se asocian a efectos permanentes de reducción de la respuesta del eje HPA al estrés en edades adultas (p. ej. Bhatnagar y Meaney, 1995; Denenberg et al., 1962, 1968; Fernández-Teruel et al., 2002; Levine 1962; Meaney et al., 1988; Meerlo et al. 1999; Núñez et al., 1996; Steimer et al., 1998;).

Los mencionados efectos de reducción de la sensibilidad (o incremento de la resistencia) al estrés, traducidos en una mejor respuesta y regulación del eje HPA en ratas que recibieron EP, van unidos a una reducción permanente de las respuestas de ansiedad y temerosidad, tanto en situaciones de novedad o pruebas incondicionadas (p. ej. Ader 1959, 1968; Bodnoff et al., 1987; Denenberg et al., 1978; De Nelsky y Denenberg 1967; Eells 1961; Ferré et al., 1995; Fernández-Teruel et al., 1990, 1991, 1992a-b, 1997, 2002; Levine y Broadhurst 1963; Steimer et al., 1998) como en tareas condicionadas o aprendidas (p.ej. Escorihuela et al., 1991, 1992, 1994a, 1995a; Levine 1956; Levine et al., 1957; Núñez et al., 1995). La EP induce, asimismo, un claro incremento de las capacidades cognitivas, de aprendizaje y memoria, e importantes efectos de prevención del deterioro de las mismas y de la neurodegeneración (hipocámpica) asociada al envejecimiento (p. ej. Aguilar et al., 2002; Daly 1973; Escorihuela et al., 1995b; Fernández-Teruel et al., 1997, 2002; Lemaire et al., 2006; Meaney et al., 1988; Pham et al., 1997; Wong

1972) (para revisión más extensa de los efectos de la EP ver Fernández-Teruel *et al.*, 2002).

La sugerencia, ya desde algunos de los primeros trabajos de Levine, de que los efectos del EP podían deberse (al menos en parte) a cambios cualitativos y cuantitativos en la atención materna resultantes de la separación, se ha visto confirmada recientemente en diversos estudios y por varios autores (p. ej. Levine, 2000; Meaney, 2001; Pryce y Feldon, 2003; ver revisión en Fernández-Teruel *et al.*, 2002). En definitiva, las madres prestan una atención incrementada a las crías (en términos de lameteo, acicalamiento, posicionamiento en los nidos, posturas activas de amamantamiento) una vez que éstas les son devueltas. No obstante, se ha demostrado que, al margen de la conducta maternal, la estimulación que supone la separación individual (de las madres y la camada, con exposición a un ambiente nuevo durante unos pocos minutos) es en sí misma un factor importante en las consecuencias positivas y perdurables de la EP (p. ej. Macri *et al.*, 2008; Tang *et al.*, 2006). Asimismo, diversos trabajos han puesto de manifiesto que la estimulación táctil postnatal (sin aislamiento ni separación maternal), por sí misma, también produce efectos cognitivos y neurobiológicos beneficiosos a largo plazo en roedores (p. ej. Daskalakis *et al.*, 2009; Denenberg 1999; Imanaka *et al.*, 2008; Schanberg y Field, 1987; Zhang y Cai 2008), así como consecuencias psicobiológicas positivas durante el desarrollo en niños prematuros (p. ej. Kuhn *et al.*, 1991; Schanberg y Filed, 1987).

Así pues, a la luz de los trabajos mencionados parece que cada uno de los tres componentes de la estimulación postnatal –EP– original (Levine 1956, 1962; Levine *et al.*, 1956, 1957), esto es, la separación maternal breve, la exposición breve a un ambiente nuevo (una caja o contenedor de reducido tamaño) y la estimulación táctil suave, induce efectos a largo plazo sobre el desarrollo y mantenimiento de funciones cognitivas (y otros procesos psicológicos), así como sobre procesos relacionados con la neurobiología del estrés y de la plasticidad neuronal.

El hecho de que la EP previene la muerte neuronal hipocámpica asociada a la edad (p. ej. Fernández-Teruel *et al.*, 1997; Meaney *et al.*, 1988) en ratas, podría estar de alguna forma en coherencia con la llamada hipótesis de la "reserva cognitiva" (Friedland 1993; Rodríguez-Álvarez y Sánchez-Rodríguez 2004; Stern *et al.*, 2002, 2006, 2009), que sugiere que ciertos tipos de estimulación/experiencias (de tipo cognitivo u otros) aumentan la conectividad neuronal en áreas cerebrales responsables del aprendizaje y la memoria. Así, las personas con mayor nivel educativo/académico y ocupaciones/actividades, y con menores niveles de estrés vital, puede ser que desarrollen redes neuronales más fuertes y elaboradas, capaces de soportar un mayor número de daños antes de mostrar signos evidentes de declive producidos por el envejecimiento normal o por la enfermedad de Alzheimer (p. ej. Mattson, 2004; Rodríguez-Álvarez y Sánchez-Rodríguez 2004). En este sentido, el hecho de que la EP facilita la LTP (y esto significa una eficacia sináptica aumentada), así como su capacidad de aumentar la resistencia al estrés y de prevenir la degeneración neural asociada al mismo y a la edad, implica un efecto protector que está contribuyendo a mantener la conectividad neural funcional durante más tiempo.

Para algunos autores, la estimulación postnatal (EP) ha constituido un tratamiento de elección en la prevención de posibles dificultades en el aprendizaje y de alteraciones neuroconductuales en niños prematuros (Kramer y Pierpont 1976; Scarr-Salapack y Williams 1973). Así, algunos autores se han centrado en la administración, varias veces al día, de caricias/masajes en la cara, extremidades y espalda de los niños (p. ej. Solkoff *et al.*, 1969), mientras que otros autores han introducido, además, flexiones de las piernas y los brazos (p. ej. Field 1986; Field *et al.* 2010). En general, los resultados obtenidos indican que los niños estimulados son más activos, que engordan más deprisa (hasta equipararse en peso a niños nacidos a término), que permanecen más tiempo despiertos y que muestran índices más elevados de habituación, orientación, maduración motora y conductual que los no manipulados (Solkoff *et al.* 1969; Field 1986; Field *et al.* 2010), así como una

disminución de los efectos fisiológicos y de comportamiento en respuesta al estrés (p.ej. Field y col., 2010; Kuhn et al., 1991; Schanberg y Field 1987).

2.4.3. Estudios de Estimulación Postnatal en ratones

Aunque existe sustancialmente más literatura sobre los efectos de la separación maternal (MS) o de la estimulación postnatal (EP) en rata que en ratón (Francis et al., 1999; Groër et al., 2002; Holmes et al., 2005; De Kloet et al., 2005), a continuación resumimos lo más relevante de los trabajos recientes realizados con modelos murinos.

Si bien los efectos y su magnitud dependen en gran medida de la cepa particular utilizada (para revisión ver, por ejemplo, Millstein y Holmes 2007), en la literatura encontramos efectos positivos de la EP en términos de mejora del aprendizaje y memoria en el laberinto acuático de Morris en diferentes ratones transgénicos (Need y Giese 2003; Tremml et al., 2002), o en la cepa BALB/c (Anisman et al., 1998; Zaharia et al., 1996).

Asimismo, el tratamiento de EP disminuye diversas respuestas conductuales consideradas indicativas de ansiedad en la cepa de ratón C57BL/6 (Parfitt et al., 2007), en la cepa NMRI (Moles et al., 2004), en ratones “*outbred*” albinos (Cabib et al., 1993; D’Amato et al., 1998) y en otras cepas consideradas como más “neofóbicas”, como las BALB/c, FVB/NJ y 129S1 (Millstein y Holmes 2007). En las cepas BALB/c y C57BL/6J, la estimulación postnatal afecta positivamente a la respuesta endocrina al estrés, disminuyéndola (Craft et al. 2006; Groër et al., 2002; Weaver et al., 2004; Zaharia et al., 1996), además de producir efectos positivos en parámetros inmunológicos y disminución de las consecuencias negativas de la separación maternal en los ratones BALB/c (Groër et al., 2002). Sin embargo, en cuanto a los efectos “ansiolíticos” conductuales y los efectos anti-estrés (hormonales) de la EP, existen también resultados negativos, y controvertidos, como el reciente trabajo de Wei et al. (2010), quienes muestran que en ratones BALB/c la EP aumenta los signos de

ansiedad y no produce los efectos esperados en las respuestas al estrés. Los autores señalan que tal controversia podría resolverse mediante estudios longitudinales en los que los efectos hormonales de la separación (de las madres) en las crías y la conducta maternal (el “lameteo” y acicalamiento incrementado de las madres a sus crías tras serles devueltas) sean monitorizadas a lo largo de todo el proceso de EP o/y separación maternal (Wei *et al.*, 2010).

Por otra parte, ratones knockout para el receptor A1 de la serotonina presentan una respuesta a la EP similar a la mencionada arriba, mostrando una reducción de la respuesta de corticosterona al estrés y de la ansiedad en el test de interacción social como consecuencia de la estimulación postnatal (Zanettini *et al.*, 2010).

La EP muestra efectos positivos también en otros modelos transgénicos de de ratón. Así, en ratones CD-1, la EP produce una reducción de la respuesta hormonal al estrés, así como un incremento en los niveles de NGF en hipocampo y de la resistencia a infecciones de patógenos (Cirulli *et al.*, 2007; Macri *et al.*, 2007).

En cuanto a efectos neurales de la EP, en ratones C57Bl/6NCrI la estimulación postnatal induce un incremento de la expresión de reelina hipocámpica (Gross *et al.*, 2010), la cual es crucial en la regulación de los procesos de migración neuronal y posicionamiento en el desarrollo del cerebro (Knuesel 2010; Knuesel *et al.*, 2009; Lussier *et al.* 2011). Además de este papel en el desarrollo temprano, en cerebro adulto la reelina interviene en la modulación de la plasticidad sináptica, mejorando el aprendizaje y el mantenimiento de la LTP (D’Arcangelo *et al.*, 2005; Lussier *et al.*, 2011; Weeber *et al.*, 2002).

Asimismo, en ratones con alta y baja agresividad (NC900 y NC100, respectivamente), el tratamiento de EP produce una regulación al alza (up-

regulation) del receptor D1 de la dopamina (Gariépy et al., 2002), y disminuye los niveles post-estrés de corticosterona en los animales NC100.

Como ya hemos comentado anteriormente, los resultados contradictorios encontrados en los efectos que produce la EP en ratones, pueden estar influenciados tanto por el tipo de cepa o base genética utilizada, como por ciertas variables durante el procedimiento de estimulación. A pesar de ello, podemos sugerir que en ratones el tratamiento de EP produce de forma consistente efectos mayoritariamente positivos en la mejora de la respuesta endocrina al estrés así como del aprendizaje y memoria.

Hipótesis y objetivos

3. PLANTEAMIENTO ESPECÍFICO, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1. PLANTEAMIENTO ESPECÍFICO

La validación de un modelo animal para la enfermedad de Alzheimer requiere que este modelo manifieste el perfil neuropatológico y cognitivo característico de la enfermedad en humanos y pueda ser reproducido por diversos laboratorios. Por otro lado, los síntomas no cognitivos (o SCPD) de la EA están poco estudiados en los modelos animales existentes, a pesar de que son dichos síntomas los que aparecen a edades más tempranas, y parece ser que son previos a la aparición de la patología β -Amiloide.

Los ratones triple-transgénicos 3xTgAD (generados en el 2003 por el Laboratorio del Prof. LaFerla, California, USA y cedidos a nuestro laboratorio desde el 2004) parecen ser uno de los mejores modelos animales para la EA y para modelar procesos neurodegenerativos acelerados (Billings *et al.*, 2005; Oddo *et al.*, 2003a). Por lo tanto, se esperaría que estos animales muestren alteraciones en paradigmas de funciones cognitivas, de aprendizaje y memoria espacial, y quizá de síntomas SCPD.

El presente trabajo forma parte de un proyecto más amplio de nuestro laboratorio, financiado por “*La Fundació Marató de TV3 (nº062930)*” y titulado “*Contrarrestando la progresión de la enfermedad de Alzheimer. Efectos de tratamientos ambientales tempranos en ratones triple transgénicos 3xTgAD*”, cuyo objetivo principal era estudiar los efectos a corto y a largo plazo de la estimulación infanto-juvenil (estimulación postnatal y enriquecimiento ambiental) sobre los déficits cognitivos/conductuales y los mecanismos neurales subyacentes en este modelo 3xTgAD. En el marco de dicho proyecto se pretende medir, en el ratón 3xTgAD (a diferentes edades), si dichos tratamientos ambientales (y otros, como la actividad física) pueden prevenir o

retardar la aparición de fenómenos asociados a la neuropatología de la EA, como, por ejemplo, el estrés oxidativo cerebral, la acumulación de beta-amiloide intraneuronal y en placas extraneuronales, la patología Tau, la plasticidad sináptica hipocámpica y la función de diversos sistemas de neurotransmisión. Tales estudios, no obstante, forman parte de otros trabajos de tesis doctoral de miembros del grupo de investigación y asociados.

Volviendo al presente trabajo, según los estudios publicados con anterioridad al inicio de esta tesis doctoral (mediados de 2005), los ratones transgénicos 3xTgAD manifestaban ciertos (pero leves) déficits cognitivos a la edad de 4 meses. Así según Billings *et al.* (2005), a esta edad los ratones 3xTgAD sólo presentaban algún déficit de memoria espacial a largo plazo, manifestándose únicamente en ciertas variables de test de memoria realizados a las 24 horas de la adquisición de una tarea de aprendizaje espacial o de la adquisición de un condicionamiento de miedo a un contexto espacial (Billings *et al.*, 2005). Los autores proponían que estos déficits tempranos en la retención podrían estar relacionados con la presencia intraneuronal de β A (presente ya a la edad de 4 meses) en hipocampo, considerado un marcador biológico potencial de inicio de la EA (Billings *et al.*, 2005).

Por otra parte, respecto a la evaluación de procesos predominantemente no cognitivos o SCPD, en 2005 aún no se había publicado ningún estudio con los ratones 3xTgAD. En nuestro laboratorio se había iniciado la evaluación de SCPD, observándose que los animales de 2.5 meses de edad mostraban niveles relativamente elevados (respecto a los ratones controles no transgénicos) de inhibición conductual o miedo/ansiedad, puestos de manifiesto por disminuciones en la actividad exploratoria (horizontal y vertical) en el test de "Campo Abierto". Esta alteración conductual era aún más evidente a los 6 meses de edad. Paradójicamente, no obstante, a esta misma edad los ratones transgénicos mostraban desinhibición conductual en el test de ansiedad de la caja blanca/negra (DLB) que se reflejaba en un incremento (respecto a los controles) del tiempo pasado en el compartimento blanco

(Blázquez, 2006; Blázquez *et al.*, 2006; Giménez-Llort *et al.*, 2006). Por tanto, entre 2005 y 2006, la cuestión de cómo eran los perfiles de comportamiento de los ratones 3xTgAD en pruebas de novedad o ansiedad/miedo no estaba resuelta. Era evidente la necesidad de estudios posteriores para clarificar el perfil de SCPD en este modelo de ratón transgénico.

Respecto a la modificación o reversión de síntomas conductuales y cognitivos en el modelo 3xTgAD mediante procedimientos/tratamientos ambientales, aún no se había publicado ningún resultado en 2005-2006. No obstante, dada la evidencia revisada en las secciones anteriores, relativa a los efectos de la estimulación postnatal sobre procesos emocionales, cognitivos y de plasticidad neural en diversas cepas de roedores (ratas y ratones), parece lógico esperar que este tratamiento pueda ejercer un papel protector frente a los déficits cognitivos y las alteraciones conductuales (no estrictamente cognitivas) que puedan aparecer en los ratones 3xTg-AD.

Para la caracterización del perfil conductual y cognitivo de este modelo, así como de los efectos de la estimulación postnatal, y basándonos en la experiencia previa de nuestro laboratorio (Escorihuela *et al.*, 1994b, 1995c; Giménez-Llort *et al.*, 2002; ver también Crawley 1985; Chadman *et al.*, 2009), en el presente trabajo hemos utilizado pruebas que ya son clásicas en roedores, como serían las medidas de actividad basal/espontánea y ritmos circadianos de la misma, el laberinto hexagonal en túnel (como medida de actividad complementaria en situación poco aversiva), el test de Campo Abierto para evaluar la reactividad emocional de los animales a través de la conducta exploratoria vertical y horizontal (en una situación de novedad, como es este test), así como el laberinto en cruz elevado o la caja blanca/negra para valorar perfiles de ansiedad/miedo. También hemos utilizado pruebas como la tabla de 16 agujeros (test de Boissier) para medir la conducta exploratoria y “curiosidad” de los animales (ver detalles de baterías de test similares en p.ej. Escorihuela *et al.* 1995c; Fernández-Teruel *et al.*, 1991; Giménez-Llort *et al.*, 2002, 2005), así como el laberinto acuático de Morris para el estudio de procesos de

aprendizaje y memoria espacial (ver p. ej. Escorihuela *et al.*, 1995b; Morris 1981; Morris *et al.*, 1986; Whishaw 1995).

Cabe decir que, al margen del tipo de estudio transversal que se plantea en el presente trabajo (ver próximas secciones), la realización de un estudio longitudinal, que abarcase medidas (repetidas) diversas relacionadas con la EA (y la patología de los ratones 3xTgAD) desde etapas juveniles a edades avanzadas, sería seguramente deseable y podría aportar datos valiosos y complementarios al estudio transversal (especialmente si ambos, transversal y longitudinal, permitiesen comparación entre ellos). Sin embargo, tal estudio longitudinal requeriría mantener y envejecer un gran número de animales de ambos genotipos y ambos sexos, con tratamiento y sin él, que deberían ser evaluados a varias edades (p. ej. 2, 4, 6, 9, 12, 15) con medidas/pruebas repetidas o muy similares. Las limitaciones de espacio constituyen un inconveniente para ello, además del hecho (importante) de que las medidas repetidas (pruebas iguales o similares aplicadas repetidamente a diferentes edades) es altamente probable que generasen resultados artefactuales, debidos al efecto de la experiencia o del entrenamiento.

3.2. OBJETIVOS

En función de todos los antecedentes revisados, los objetivos del presente trabajo son:

- La valoración/caracterización basal, y a diferentes edades (y fases neuropatológicas), de este modelo en relación a ritmos circadianos de actividad y funciones sensorimotoras básicas y neofobia.
- La caracterización conductual, cognitiva y no cognitiva (síntomas SCPD), del modelo de ratón 3xTgAD en etapas iniciales de la enfermedad.

- La evaluación de los efectos protectores de la estimulación cognitiva y sensorial a través de la estimulación postnatal (EP).

Para tales objetivos generales, se definieron los siguientes planteamientos experimentales:

1. El estudio transversal de las funciones sensorimotoras básicas, niveles de neofobia y de los ritmos circadianos en animales de 2, 6, 9, 12 y 15 meses de edad y en ambos sexos. Para poder valorar las asociaciones entre ciertos síntomas de la enfermedad y los factores edad y sexo, ya que el modelo desarrolla de manera progresiva las patologías de la β A y Tau, con un perfil temporal y anatómico específico que reproduce el patrón que tiene lugar al cerebro humano con enfermedad de Alzheimer.
2. La caracterización conductual del modelo 3xTg-AD en animales de 4 meses de edad, que se encuentran en una fase prepatológica en la que se ha descrito la presencia de β A intraneuronal a nivel de corteza y de hipocampo. El estudio conductual abordará:
 - a. La caracterización del perfil cognitivo mediante la evaluación del aprendizaje y memoria espacial a corto y largo plazo en varias tareas en el laberinto acuático de Morris.
 - b. La caracterización del perfil emocional y de SCPD evaluando la respuesta conductual (emotividad /ansiedad) de los animales en el Campo Abierto, la tabla de 16 agujeros de Boissier, la caja blanca/negra, el laberinto en cruz elevado y el laberinto hexagonal en túnel.
 - c. El estudio de los cambios en el ritmo circadiano a esta edad.

- d. La valoración del efecto del tratamiento de estimulación postnatal (EP), administrado durante los primeros 21 días de vida, tanto a nivel cognitivo (aprendizaje/memoria espacial) como del perfil emotivo o de SCPD, cuando los animales tengan 4 meses de edad.

3.3. HIPÓTESIS

Las hipótesis concretas subyacentes a este planteamiento experimental son:

1. Dado que la patología amiloide y Tau se agrava progresivamente con la edad, sería esperable hallar alteraciones sensorimotoras y/o de respuestas neofóbicas (respecto a los animales control no transgénicos) a medida que los ratones 3xTgAD envejecen.
2. Puesto que, trabajos previos y preliminares realizados en nuestro laboratorio hasta 2005, muestran que animales 3xTgAD de 2.5, 6 y 12 meses de edad presentan una tendencia a la disminución de la actividad circadiana total respecto a los animales control, esperaríamos que este patrón de hipoactividad se mantuviese en todas las edades estudiadas (esto es, desde los 2 meses a los 15 meses de edad).
3. Si, como hemos señalado arriba, los ratones 3xTgAD de 2.5 y 6 meses muestran inhibición conductual en el test de Campo Abierto, y dado que a los 4 meses de edad presentan acumulación de beta-amiloide intraneuronal (relacionada con déficits sinápticos hipocámpicos), podemos esperar signos de inhibición conductual en los ratones 3xTgAD de 4 meses expuestos al Campo Abierto y otros tests de novedad, así como déficits de memoria en una tarea espacial.

4. Si la estimulación postnatal generalmente produce efectos positivos en procesos emocionales (ansiedad, respuestas de estrés, etc.), cognitivos y de plasticidad neuronal en roedores, sería esperable que pudiese contribuir a normalizar o mejorar las alteraciones en SCPD y los déficits cognitivos que puedan aparecer en el modelo 3xTgAD a los 4 meses de edad.

Estudio I

4. ESTUDIO I. ESTUDIO TRANSVERSAL DE LOS CICLOS CIRCADIANOS, NEOFOBIA Y FUNCIONES SENSORIMOTORAS BÁSICAS

4.1. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1.1. Animales

Se utilizaron machos y hembras (n=269 en total) procedentes de las colonias de ratones 3xTgAD homocigotos (Tg) y de no transgénicos “C57BL/6 x 129/Sv” (NTg; como cepa control), mantenidas en nuestro laboratorio de la Unidad de Psicología Médica, del Departamento de Psiquiatría y Medicina Legal e Instituto de Neurociencias de la Universidad Autónoma de Barcelona. Los animales del mismo genotipo, sexo y edad fueron mantenidos en grupos de 2 a 4, en jaulas de Macrolón (35x35x25 cm), bajo condiciones estándares de laboratorio con agua y comida ad libitum, temperatura (22±2°C), humedad (entre el 50-60%) y ciclo de luz/oscuridad de 12 horas (con inicio de luces a las 08:30h) controladas a diario. Los animales fueron estudiados a los 2, 6, 9, 12 y 15 meses de edad (ver tabla 4.1), de forma que así tenemos una representación de las diferentes etapas neuropatológicas descritas en este modelo animal (Oddo *et al.*, 2003b). Los animales se trataron en todo momento de acuerdo con la legislación Española sobre “Protección de animales utilizados para la experimentación y otros fines científicos” y de conformidad con la Directiva de la UE 08-88 sobre este tema.

Tabla 4.1. Número de animales utilizados para cada grupo experimental y edad (n=269 ratones)

	2m	6m	9m	12m	15m
Machos NT	14	18	12	12	12
Machos Tg	14	14	12	15	13
Hembras NT	14	14	12	12	14
Hembras Tg	14	14	12	12	15

4.1.2. Estudios conductuales

El estudio transversal se realizó a través de una serie de pruebas o batería conductual estandarizada, utilizada previamente en nuestro laboratorio y útil para detectar alteraciones conductuales en roedores (Escorihuela et al., 1994b, 1995c; Giménez-Llort et al., 2002). La batería conductual, se inició con la valoración de la neofobia a través del test de las esquinas (*Corner test*, “CT”; Arranz et al., 2009; García et al., 2011; Giménez-Llort et al., 2007, 2010), y se continuó con una serie de pruebas sensorimotoras (SMT; Escorihuela et al., 1995c; Giménez-Llort et al., 2002, 2007 y 2010; García et al., 2011) para evaluar las condiciones físicas de los animales y descartar posibles alteraciones motoras gruesas antes de estudiar el patrón de actividad basal espontánea durante las 24 horas del ciclo luz-oscuridad (Giménez-Llort et al., 2007). Las pruebas CT y SMT se realizaron en una sala contigua, un día antes de la valoración de la actividad motora basal y siempre dentro de un rango horario delimitado entre las 10:00 y las 13:00 h, para evitar efectos debidos al ritmo circadiano.

4.1.2.1. Test de neofobia o de las esquinas

El test de las esquinas (CT, “*Corner test*”) es utilizado para evaluar la neofobia o el miedo a la novedad, y consiste en introducir al animal en el centro de una jaula de plástico estándar (jaula idéntica a la que se utiliza para la estabulación) con viruta limpia y sin olores (ver Fig. 4(I)).

En este test se evalúa la conducta espontánea del animal durante un periodo de 30 segundos y se anota el número de esquinas o “*corners*” explorados (el animal tiene que oler y explorar la esquina aunque sea durante escasos segundos) y el número de “*rearings*” o levantamientos verticales realizados (el animal tiene que levantar las patas delanteras). En esta prueba se utiliza una jaula nueva (limpia) para cada animal, para evitar posibles interferencias en esta conducta debido al rastro de olor de otro animal.



Figura 4(I). Test de neofobia o *Corner test*.

4.1.2.2. Prueba de las funciones sensorimotoras

Esta prueba de las funciones sensorimotoras (SMT) evalúa varios aspectos de las condiciones físicas y sensoriales de los animales, como serían los reflejos visuales, el equilibrio, la fuerza y la coordinación motora. El test está formado por cuatro pruebas complementarias (ver Fig. 4(II)).

La primera prueba: es una plancha de plástico negra (32x32 cm) y medimos tres veces consecutivas los reflejos visuales del animal mientras lo cogemos de la cola y lo aproximamos lentamente a la plancha. Al acercarse progresivamente a la plancha el animal ha de extender las patas delanteras antes de chocar con ella (puntuación “1”).

La segunda y tercera prueba: se trata de una barra de madera cuadrada y otra barra cilíndrica y metálica de 1cm de diámetro y 50 cm de largo, divididas en 8 segmentos y elevadas del suelo unos 40 cm. Se coloca el animal en el centro de cada barra durante dos ensayos consecutivos de 20 segundos cada uno y se mide la latencia de caída y el número de segmentos recorridos. Esta prueba es un reflejo tanto del equilibrio como de la coordinación motora del animal. Entre los diferentes ensayos dejamos descansar al animal unos 20 segundos.

La cuarta prueba: consiste en una percha metálica (de unos 2 mm de diámetro y 40 cm de longitud) dividida en 8 segmentos (de 5 cm de distancia entre ellos) y elevada del suelo unos 40 cm. Colgamos el animal suavemente de las patas

delanteras en el centro de la percha y realizamos dos ensayos de 5 segundos y un tercer ensayo de 60 segundos, con intervalos de descanso entre ellos de 20 segundos. En esta prueba se mide la latencia de caída, el número de segmentos recorridos. Con estas pruebas podemos evaluar la resistencia y fuerza de agarre, así como la coordinación motora que presentan los animales.



Figura 4(II). Pruebas sensorimotoras (barra de madera y percha metálica), tras realizar la prueba de “reflejo visual”(ver texto).

4.1.2.3. Actividad basal espontánea durante 24h en función de la edad

El aparato consiste en una plancha horizontal con un sistema de detección del movimiento a través de unas células fotoeléctricas distribuidas a modo de cuadrados concéntricos, que permiten medir la actividad de manera automática. Las unidades de medida de la actividad, son el número de interrupciones de fotocélulas o *counts*. Registramos la actividad locomotora basal del animal ininterrumpidamente a lo largo de todo el periodo del ciclo luz-oscuridad (durante 23:30 horas) a través de cuatro placas de actividad controladas por el programa Actitrack (Panlab, S.L, Barcelona, ver Fig. 4(III)).

Una vez se encienden las luces del estabulario (8:30 horas) transportamos a los animales a la sala de experimentación, registramos el peso y colocamos cada animal individualmente en una jaula idéntica a la de estabulación con viruta limpia. La sala se mantiene bajo condiciones estándares de estabulación (temperatura de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, humedad a 50-60% y ciclo de luz /oscuridad de 12 horas, con inicio de luces a las 08:00h) y con acceso al agua y comida ad libitum durante las 24 horas.

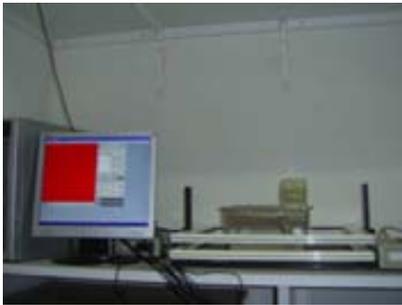


Figura 4(III). Prueba de la actividad espontanea circadiana (Actimetría).

4.1.3. Análisis estadístico

Los resultados se expresan como media \pm error estándar de la media (SEM) en todas las figuras y tablas. El análisis estadístico se realizó mediante el programa estadístico SPSS (versión 17.0). Para comparar los diferentes grupos y edades se utilizó el análisis factorial de la varianza ANOVA (2"genotipos"x 2"sexos"x 5"edades"), seguido de contrastes *post hoc* mediante la prueba de Duncan's test cuando del análisis de varianza surgieron interacciones significativas. En el caso de los resultados de la actividad a lo largo del ciclo luz-oscuridad, se analizó, además, cada edad por separado, con un ANOVA de medidas repetidas (MANOVA), con dos factores intersujetos ("genotipo"x "sexo") y un factor intrasujetos ("tiempo"). En todos los casos la significación estadística se estableció en $p < 0.05$.

4.2. RESULTADOS ESTUDIO I

4.2.1. Test de Neofobia o de las esquinas

En la Figura 4.1(A-D) se representan tanto el número total de esquinas exploradas como la conducta vertical que realizan los animales durante los 30 segundos que dura el test, y a las 5 edades diferentes en que se administró.

El ANOVA global del total de esquinas exploradas, incluyendo las 5 edades y los dos sexos, muestra efectos significativos de la edad ($F_{(1,252)}=3.8$, $p=0.004$), indicativo de un descenso progresivo de dicha conducta a medida que la edad avanza, y un claro efecto del genotipo ($F_{(1,252)}=84.5$, $p\leq 0.001$) (Fig. 4.1A-B) en el sentido de que los ratones 3xTgAD presentan sistemáticamente niveles reducidos de dicha variable/conducta exploratoria (Fig. 4.1A-B; ver contrastes con pruebas de Duncan).

El ANOVA global del total de exploraciones o levantamientos verticales (*rearings*, en inglés), incluyendo las 5 edades y los dos sexos, muestra efectos significativos tanto de la edad ($F_{(1,252)}=8.69$, $p\leq 0.001$), como del genotipo ($F_{(1,252)}=60.7$, $p\leq 0.001$) y del sexo ($F_{(1,252)}=7.23$, $p=0.008$) (Fig. 4.1C-D). El efecto de la edad es de nuevo debido a la disminución del número de exploraciones que se produce a medida que avanza la edad, mientras que el efecto del genotipo refleja también una reducción global en el número de levantamientos por parte de los animales transgénicos (ver test de Duncan, Fig. 4.1C-D). En el caso del efecto sexo, éste nos indica que las hembras presentan una menor actividad vertical (levantamientos) que los machos.

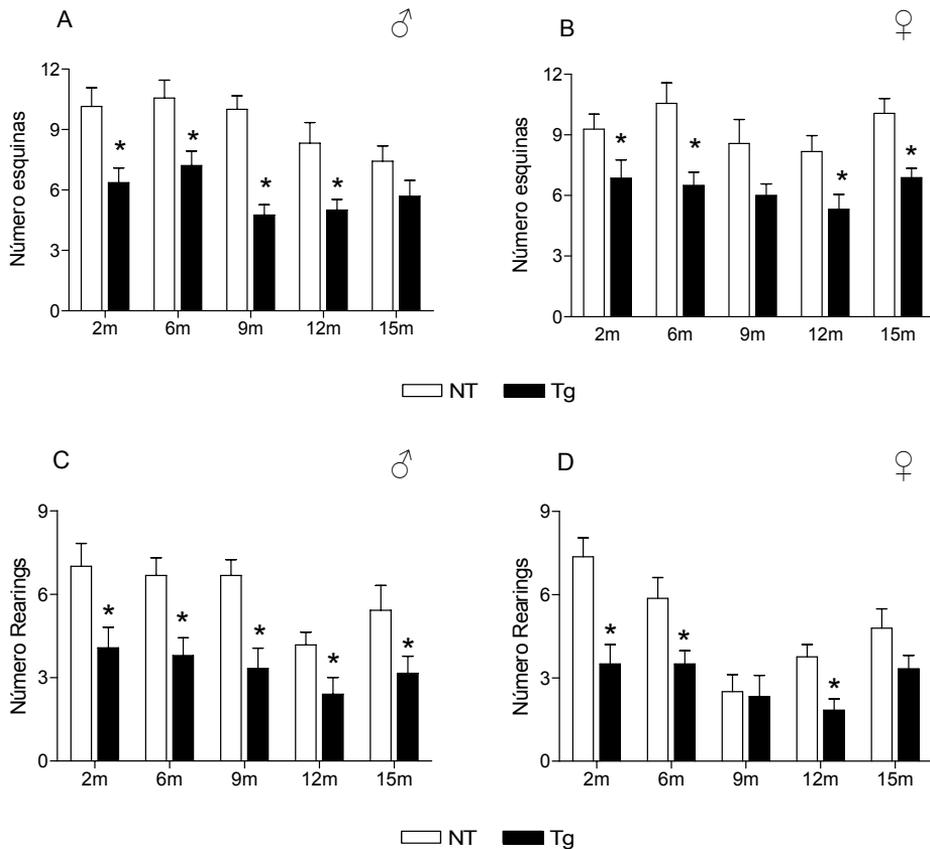


Figura 4.1. Evaluación conductual en el test de neofobia (*Corner test*). **A y B)** Número total de esquinas exploradas durante toda la sesión. **C y D)** Total de *rearings* o levantamientos verticales. Duncan test, *P < 0.05, 3xTgAD vs NT del mismo sexo.

4.2.2. Prueba de las funciones sensorimotoras

En la prueba del reflejo visual, se observó que el 100% de los animales de ambos genotipos y todas las edades mostraron resultados positivos al aproximarlos a la plancha. Todos identificaron correctamente la proximidad a la plancha y fueron puntuados con el valor “1”.

En la Figura 4.2A-D se representa el tiempo de latencia o permanencia en el test de la barra de madera y en la prueba de la barra metálica (la Tabla 4.2 representa la distancia recorrida por los animales en la prueba de la barra de

madera), mientras que el tiempo de suspensión en la prueba de la percha metálica se representa en la figura 4.3A-D. A través de estas pruebas sensorimotoras se estudia tanto la capacidad de equilibrio como de coordinación motora que presentan los ratones, así como la fuerza de agarre y la resistencia (prueba de la percha metálica).

El ANOVA global del tiempo de latencia en la barra de madera, muestra un efecto significativo de la edad ($F_{(4,252)}=2.5$, $p=0.04$), y del genotipo ($F_{(1,252)}=26.0$, $p\leq 0.001$), así como una interacción “genotipo x edad” ($F_{(4,252)}=2.6$, $p=0.037$). Tales efectos indican que con la edad disminuye la latencia de caída, o capacidad de equilibrio, y la interacción nos indica que esta disminución se produce principalmente en los animales no transgénicos (NTg) en ambos sexos (ver test de Duncan, Fig. 4.2A-B).

Sobre la distancia recorrida en la barra (en cm), como reflejo de coordinación motora, encontramos un efecto de la edad ($F_{(4,251)}=8.9$, $p<0.001$) y una interacción “edad x sexo” ($F_{(4,251)}=4.5$, $p=0.001$), siendo los animales de 2 meses de edad, y en especial machos, los que muestran un mayor número de segmentos recorridos (Tabla 4.2). Cabe destacar que no existe influencia significativa del factor “genotipo”, lo que indica que los ratones 3xTgAD presentan coordinación motora/equilibrio similar a los NTg.

Tabla 4.2. Se representa la distancia recorrida por los animales en la prueba de la barra de madera. Resultados expresados como media±error estándar

	NTg				3xTgAD			
	MACHO		HEMBRA		MACHO		HEMBRA	
2m	20.79	± 7.8	8.86	± 2.9	22.14	± 7.2	7.86	± 3.3
6m	5.44	± 1.7	3.00	± 1.7	2.00	± 0.8	4.86	± 2.5
9m	0.33	± 0.1	1.58	± 0.7	4.08	± 2.5	7.50	± 2.9
12m	2.17	± 0.8	11.50	± 4.5	3.27	± 1.2	4.75	± 2.4
15m	8.42	± 2.8	2.86	± 1.1	6.70	± 3.1	5.94	± 1.9

El ANOVA aplicado al tiempo de latencia en la barra metálica (ver Fig. 4.2 C-D), muestra un efecto significativo de la edad ($F_{(4,252)}=17.1$, $p\leq 0.001$), del genotipo ($F_{(1,252)}=78.5$, $p\leq 0.001$) y del sexo ($F_{(1,252)}=7.8$, $p=0.006$), así como una interacción “sexo x edad” ($F_{(4,252)}=2.5$, $p=0.041$). Estos efectos nos indican que a medida que avanza la edad, los animales muestran una menor latencia de caída (caen antes) de la barra metálica. Son los animales no transgénicos los que presentan una latencia de caída mucho menor respecto a los animales transgénicos en todas las edades (ver test de Duncan, Fig.4.2 C-D). Las diferencias sexuales las encontramos especialmente en edades jóvenes (2 y 6 meses), en donde las hembras muestran un mayor tiempo de latencia que los machos (ANOVA, efecto “sexo” a los 2 meses; $F_{(1,52)}=10.9$, $p=0.002$; a los 9 meses $F_{(1,56)}=6.2$, $p=0.015$) (ver Fig. 4.2C-D).

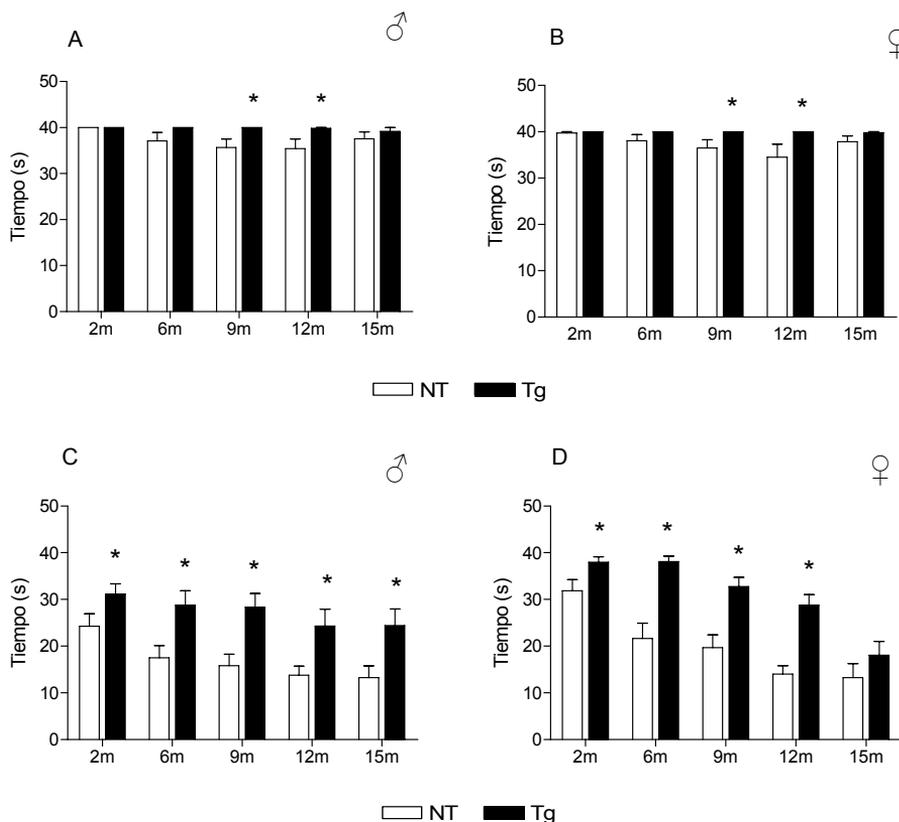


Figura 4.2. Evaluación en la batería sensorimotora. **A y B)** Latencia o tiempo de caída de la barra de madera (2 ensayos de 20 seg). **C y D)** Latencia o tiempo de caída de la barra metálica (2 ensayos de 20 seg). Duncan test, * $P < 0.05$, 3xTgAD vs NT del mismo sexo.

El ANOVA global del tiempo de latencia de caída de la percha metálica en los dos primeros ensayos de 5 segundos, muestra un efecto significativo de la edad ($F_{(4,252)}=6.2$, $p\leq 0.001$), del genotipo ($F_{(1,252)}=26.4$, $p\leq 0.001$), y una interacción “genotipo x edad” ($F_{(4,252)}=2.9$, $p=0.02$). Tales efectos indican que con la edad disminuye el tiempo que pasa el animal suspendido (o fuerza de agarre), y que esta disminución es más marcada en los animales no transgénicos y en particular a los 12 meses de edad (efecto “genotipo” a los 12 meses, $F_{(1,47)}=14.4$, $p\leq 0.001$; ver test de Duncan, Fig. 4.3 A-B).

El ANOVA aplicado a la latencia o tiempo que pasa el animal suspendido en el test de la percha durante 60 segundos, que es un reflejo de la resistencia física de estos animales, nos muestra un efecto significativo de la edad ($F_{(4,252)}=5.2$, $p\leq 0.001$), del genotipo ($F_{(1,252)}=38.5$, $p\leq 0.001$) y del sexo ($F_{(1,252)}=16.9$, $p\leq 0.001$), así como una interacción “genotipo x edad” ($F_{(4,252)}=2.4$, $p=0.049$).

Estos efectos nos indican que las hembras muestran un mayor tiempo de latencia de caída o mayor resistencia que los machos, que en ambos sexos el paso de la edad disminuye el tiempo de latencia y que los animales no transgénicos vuelven a presentar una menor resistencia respecto a los animales transgénicos (ver test Duncan, Fig. 4.3C-D).

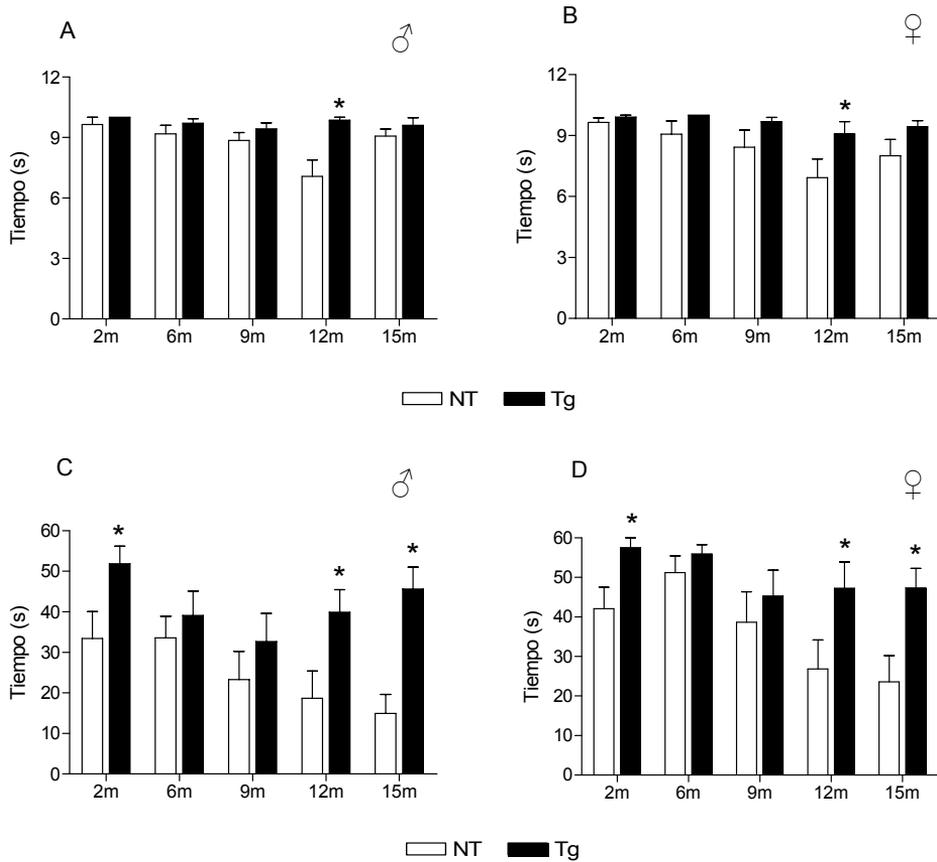


Figura 4.3. Evaluación en la batería sensorimotora. **A y B)** Latencia o tiempo de caída de la percha metálica (dos ensayos de 5 seg). **C y D)** Latencia o tiempo de caída de la percha metálica durante 60 seg. Duncan test, * $P < 0.05$, 3xTgAD vs NT del mismo sexo.

4.2.3. Actividad espontánea durante 24h en función de la edad

La Figura 4.4A-B muestra la actividad motora basal (o espontánea) acumulada durante todo el ciclo circadiano (24 horas). El ANOVA global incluyendo ambos sexos y todas las edades, muestra tan sólo un efecto marginal del genotipo ($F_{(1,249)}=3.47$, $p=0.063$) en la actividad espontánea total.

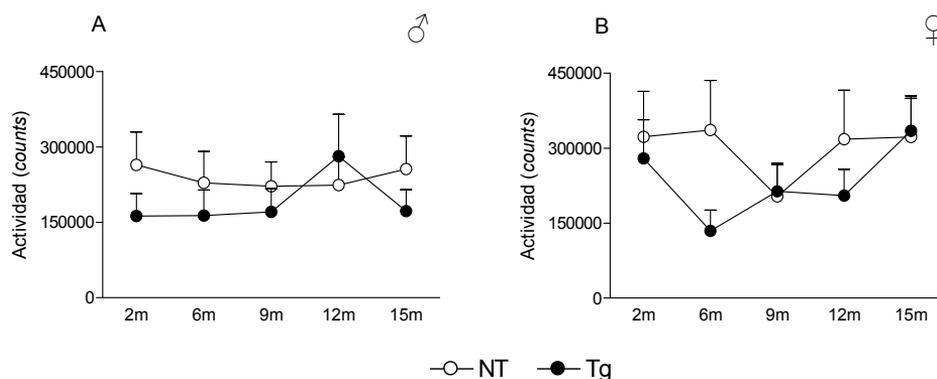


Figura 4.4. Resultados de actividad mostrados en *counts*. **A** y **B**) Actividad locomotora espontánea acumulada durante todo el ciclo circadiano (24 horas).

La Figura 4.5A-D representa el total de actividad que presentan los animales durante la fase de luz y la fase de oscuridad, mientras que la actividad durante los primeros 30 minutos de cada fase se representa en la figura 4.6A-D. Se observa que el efecto del factor intrasujeto “día-noche” es altamente significativo ($F_{(1,249)}=25.4$, $p<0.001$), reflejando el incremento global –a través de genotipos y edades- de la actividad espontánea durante la fase oscura del ciclo (Fig. 4.5 A-D), mientras que de los otros posibles efectos sólo aparece una tendencia a la significación del “genotipo” ($F_{(1,249)}=3.4$, $p=0.065$), como ya se observó en el análisis anterior.

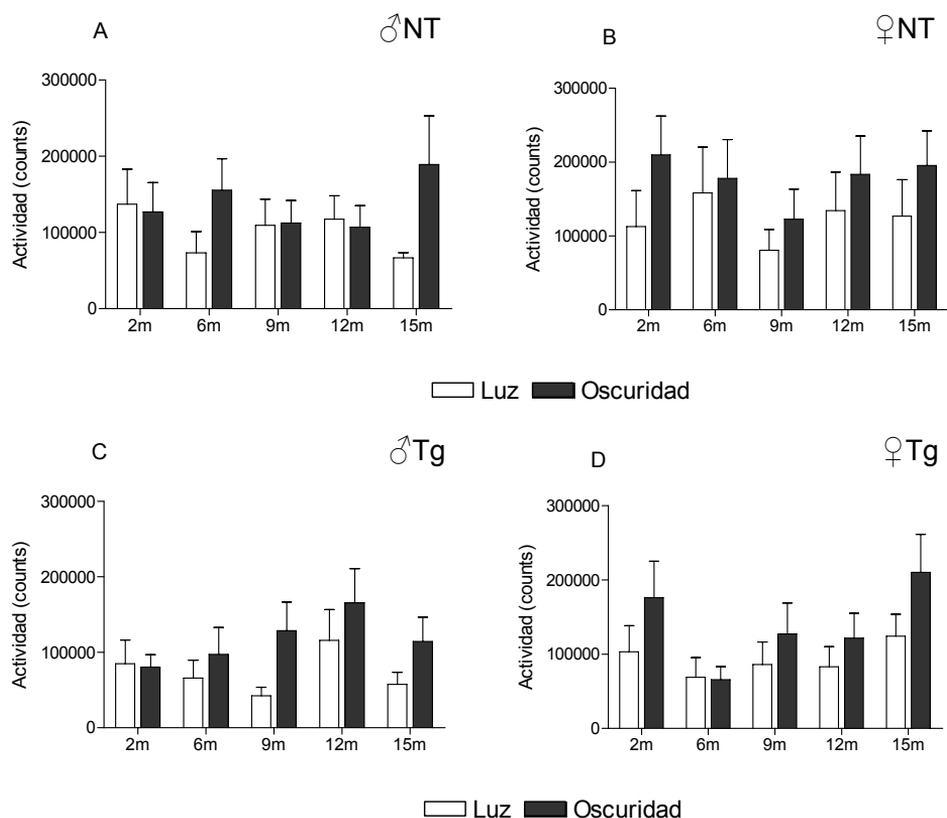


Figura 4.5. Resultados de actividad locomotora mostrados en *counts*. **A y B)** Actividad locomotora espontánea acumulada durante la fase de luz y la fase de oscuridad en animales NT. **C y D)** Actividad motora espontánea acumulada durante la fase de luz y la fase de oscuridad en animales 3xTgAD.

El análisis de los primeros 30 minutos de actividad durante la fase de luz, interesantes por reflejar la respuesta de los animales al aislamiento y la novedad, muestra un efecto del genotipo (ANOVA 2 “genotipo” x 2 “sexo” x 5 “edad”, $F_{(1,249)}=4.02$, $p=0.046$), lo que indica que los animales transgénicos presentan una menor actividad como resultado de la exposición individual a un ambiente desconocido (Fig. 4.6 A-B). Durante los primeros 30 minutos de la fase de oscuridad, en cambio, encontramos un efecto “sexo x genotipo” ($F_{(1,249)}=4.4$, $p=0.036$), que nos indica que las hembras NTg muestran mayor actividad durante esa primera fase del ciclo de oscuridad. Analizando dicha interacción con ANOVA separados para cada sexo encontramos que no aparecen efectos significativos en machos (Fig. 4.6 C), mientras que las hembras muestran un efecto de la edad ($F_{(4,126)}=2.6$, $p=0.039$), indicativo éste

de un aumento de la actividad a medida que avanza la edad y en ambos genotipos (ver pruebas de Duncan en Fig.4.6 D).

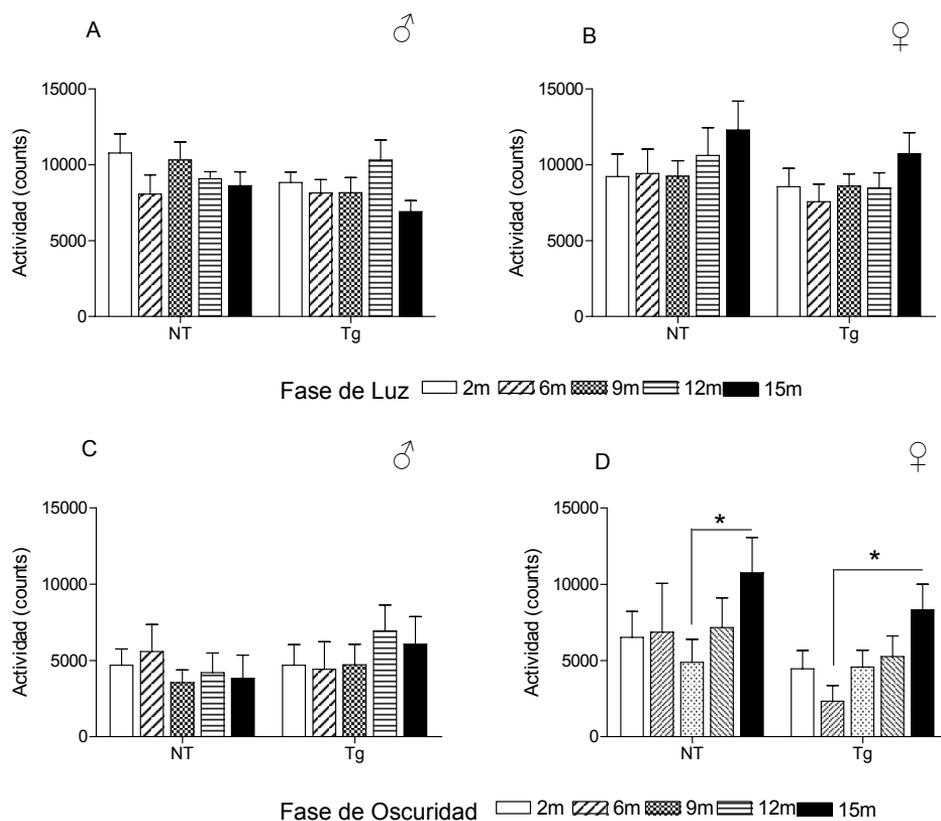


Figura 4.6. Resultados de actividad mostrados en *counts*. **A y B)** Actividad durante los primeros 30 minutos de exposición en la fase de luz. **C y D)** Actividad durante los primeros 30 minutos de la fase de oscuridad. Duncan test, * $P < 0.05$, efecto de la edad; 15 meses vs 6 o 9 meses del mismo genotipo y sexo.

Puesto que puede ser útil para hallar efectos más específicos, se han completado los análisis anteriores de “totales de actividad” o “totales de actividad de día o de noche”, representados en las Figuras 4.4A-B y 4.5A-D respectivamente, con un análisis adicional mediante ANOVA con medidas repetidas (MANOVA) teniendo en cuenta la “hora” como factor intrasujeto. El MANOVA global mostró cambios significativos en el nivel de actividad de los animales a lo largo del ciclo luz-oscuridad (Fig. 4.7 A-J), con un efecto del factor “hora” ($F_{(4,1,1032,2)}=23.93$, $p < 0.001$) y un efecto marginal del genotipo

($F_{(1,249)}=3.4$, $p=0.065$; tendencia, ya vista arriba, a que los ratones 3xTgAD sean globalmente menos activos).

A pesar de que no surjan efectos globales de la “edad”, realizamos un análisis para cada edad por separado, con el objeto de “diseccionar” en más detalle los resultados. Asimismo, puesto que diferencias en actividad motora basal pueden influir decisivamente o hallarse en la base de los resultados de diversos tipos de pruebas conductuales, se han realizado análisis de esta variable durante las 5 primeras horas de la fase diurna del ciclo de luz-oscuridad (equivaldría a un horario de 8:30 h a 13:30 h aproximadamente), periodo durante el que se suelen realizar las pruebas conductuales. Un ANOVA global (2 “genotipo” x 2 “sexo” x 5 “edad”) de la actividad motora durante las 5 primeras horas de la fase de luz muestra, en efecto, únicamente un efecto del genotipo ($F_{(1,249)}= 5.7$, $p=0.018$) que, como se ve en la Tabla 4.3, refleja claramente que los ratones 3xTgAD desarrollan menor actividad motora/espontánea que los NTg durante ese periodo.

Tabla 4.3. Actividad motora durante las 5 primeras horas de la fase de luz

	NT				3xTgAD			
	MACHO		HEMBRA		MACHO		HEMBRA	A
2m	74380.6	± 19201.3	59815.1	± 21263.1	47392.9	± 15286.1	52103.1	± 16325.7
6m	45422.3	± 11962.1	67286.6	± 23492.5	38666.2	± 11849.6	37626.3	± 13325.8
9m	62891.0	± 15755.9	44313.5	± 9414.3	26846.1	± 6309.1	43754.4	± 11415.8
12m	65565.8	± 12758.7	72075.0	± 23530.5	58290.0	± 16298.7	42090.1	± 9400.1
15m	49427.2	± 5356.5	69262.4	± 21447.4	34821.4	± 8433.4	60322.2	± 13571.4

A la edad de 2 meses, el MANOVA global, mostró cambios significativos en el nivel de actividad de los animales a lo largo del ciclo luz-oscuridad, con un efecto del factor “hora” ($F_{(3.6,188.5)}=4.07$, $p=0.005$) y una interacción “sexo x hora” ($F_{(3.6,188.5)}=3.4$, $p=0.012$) (Fig. 4.7 A-B). Si aplicamos un MANOVA independiente para el ciclo de luz (diurno) y otro para el ciclo de oscuridad (nocturno), podemos observar como esta variación de la actividad es

significativa sólo durante el ciclo diurno, observándose un efecto del factor “hora” ($F_{(5.7,298.4)}= 9.02$, $p\leq 0.001$), que refleja la habituación de la actividad a través de las horas en ambos sexos (Fig. 4.7 A-B).

En la fase nocturna, el MANOVA muestra un efecto del sexo ($F_{(1,52)}=4.5$, $p=0.037$; globalmente las hembras realizan mayor actividad que los machos) y una interacción “sexo x hora” ($F_{(7.3,379.6)}=3.1$, $p=0.003$), indicativa de que dependiendo del sexo, el efecto de las horas es totalmente contrario, los machos, especialmente los 3xTgAD, desarrollan habituación mientras que las hembras muestran una mayor actividad durante el ciclo de oscuridad (Fig. 4.7A-B).

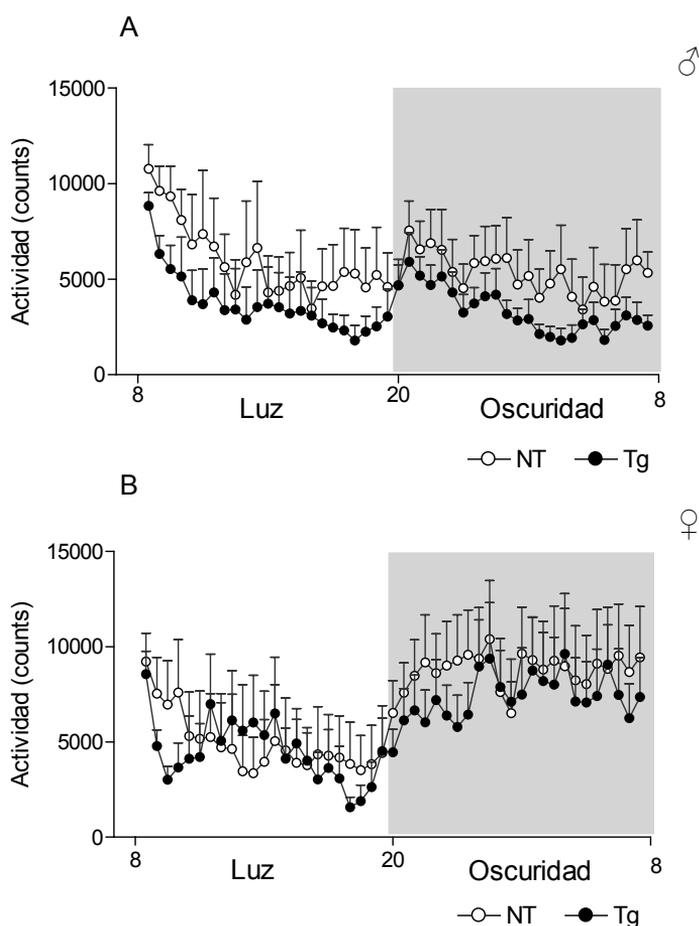


Figura 4.7. A y B) Actividad locomotora a lo largo del ciclo luz-oscuridad (24 horas) en animales de 2 meses de edad. Resultados mostrados en *counts*.

A la edad de 6 meses, el MANOVA global mostró cambios significativos en el nivel de actividad de los animales a lo largo del ciclo luz-oscuridad, con un efecto del factor “hora” ($F_{(3,7,208,4)}=3.8$, $p=0.006$), y un efecto casi significativo del genotipo ($F_{(1,56)}=3.9$, $p=0.053$) (Fig. 4.7 C-D).

Y si aplicamos un MANOVA independiente para cada periodo (luz u oscuridad), podemos observar como esta variación de la actividad es significativa sólo durante el ciclo diurno, mostrando un efecto del factor “hora” ($F_{(6,2,350,4)}=12.03$, $p\leq 0.001$) (Fig. 4.7 C-D), mientras que durante la fase oscura aparece un efecto del genotipo ($F_{(1,56)}=4.6$, $p=0.036$) que refleja una mayor actividad motora nocturna por parte de los animales NTg (Fig. 4.7 C-D).

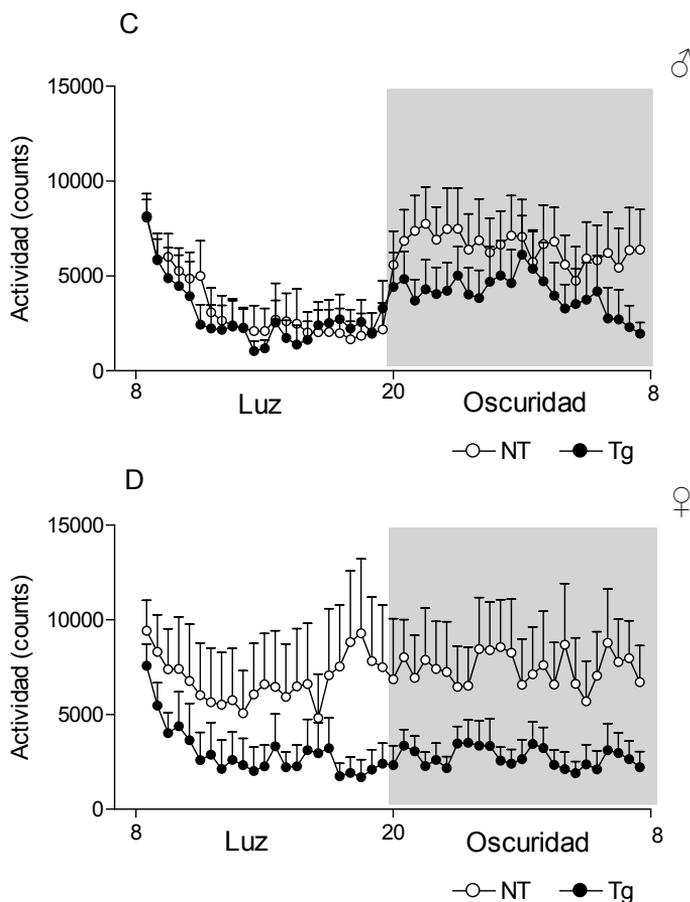


Figura 4.7. C y D) Actividad locomotora a lo largo del ciclo luz-oscuridad (24 horas) en animales de 6 meses de edad. Resultados mostrados en *counts*.

A la edad de 9 meses, el MANOVA global mostró también cambios significativos en el nivel de actividad de los animales a lo largo del ciclo luz-oscuridad, con un efecto del factor “hora” ($F_{(46,202.4)}=5.8, p<0.001$) (Fig 4.7 E-F).

El MANOVA aplicado independientemente para cada periodo del ciclo luz-oscuridad sólo muestra un efecto del factor “hora” ($F_{(6.2,350.4)}=12.03, p\leq 0.001$) durante el ciclo diurno, como reflejo de la habituación de la actividad a través de las horas y en ambos sexos (Fig. 4.7 E-F).

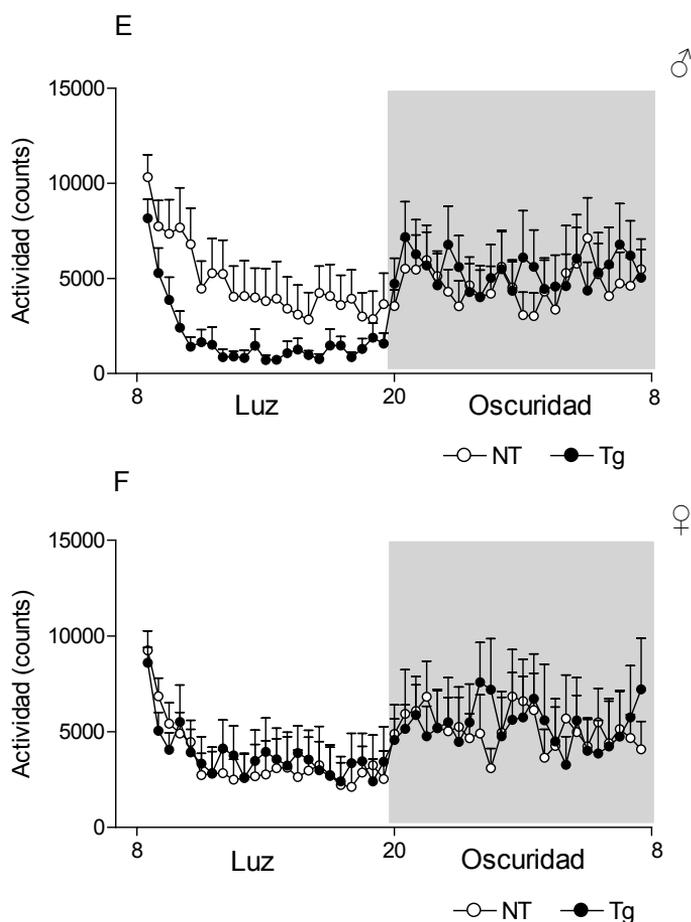


Figura 4.7. E y F) Actividad locomotora a lo largo del ciclo luz-oscuridad (24 horas) en animales de 9 meses de edad. Resultados mostrados en *counts*.

A la edad de 12 meses, el MANOVA global de todo el ciclo circadiano mostró cambios significativos en el nivel de actividad de los animales, con un efecto del factor “hora” ($F_{(7.4,348.9)}=6.2$, $p<0.001$) (Fig. 4.7 G-H).

El MANOVA independiente para cada periodo del ciclo luz-oscuridad nos muestra una variación de la actividad significativa en ambos periodos, observándose un efecto del factor “hora” tanto en la fase de luz ($F_{(9.2,436.7)}=14.2$, $p\leq 0.001$) como durante la fase oscura (efecto del factor “hora” $F_{(8.7,408.9)}=2.8$, $p=0.004$) (Fig. 4.7 G-H).

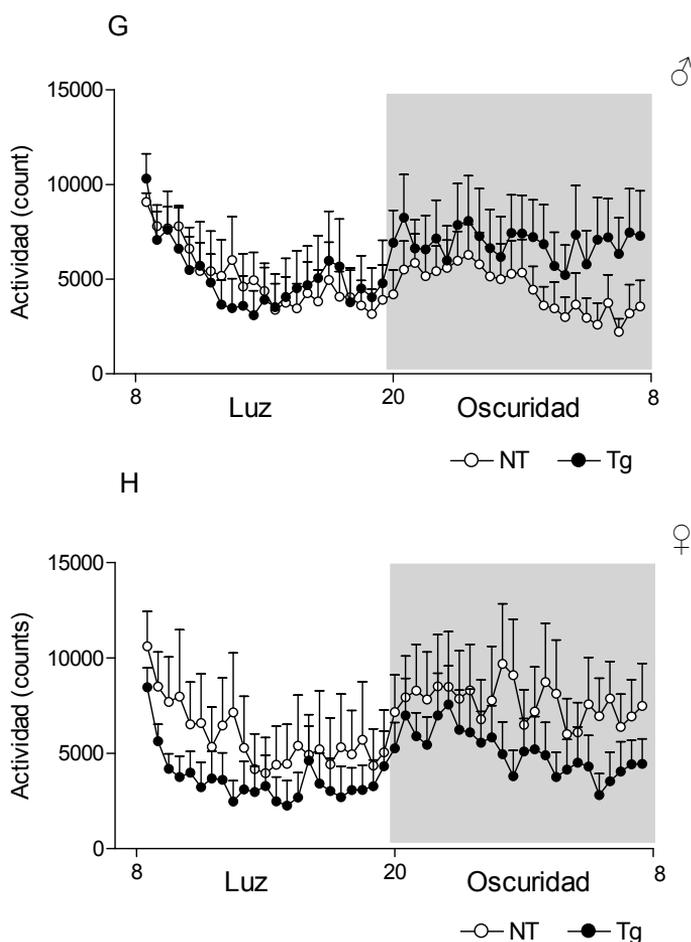


Figura 4.7. G y H) Actividad locomotora a lo largo del ciclo luz-oscuridad (24 horas) en animales de 12 meses de edad. Resultados mostrados en (counts).

A la edad de 15 meses, el MANOVA global del ciclo circadiano mostró cambios significativos en el nivel de actividad de los animales, con un efecto del factor “hora” ($F_{(3.5,179.5)}=7.4$, $p<0.001$) (Fig. 4.7 I-J). El MANOVA independiente para cada periodo del ciclo luz-oscuridad muestra únicamente efectos significativos durante la fase de luz, con un efecto del factor “hora” ($F_{(6.4,321.4)}=18.4$, $p\leq 0.001$) y efectos marginales de “hora x genotipo” ($F_{(6.4,321.4)}=2.1$, $p=0.051$) (Fig. 4.7 I-J). Desglosando esta interacción, se observa que es debida a que en machos se da un efecto “hora x genotipo” ($F_{(22,440)}=1.58$, $p=0.047$) debido a la tendencia a una menor actividad en los animales 3xTgAD durante las primeras horas que desaparece en las horas centrales y finales de la fase de luz (Fig. 4.7 I).

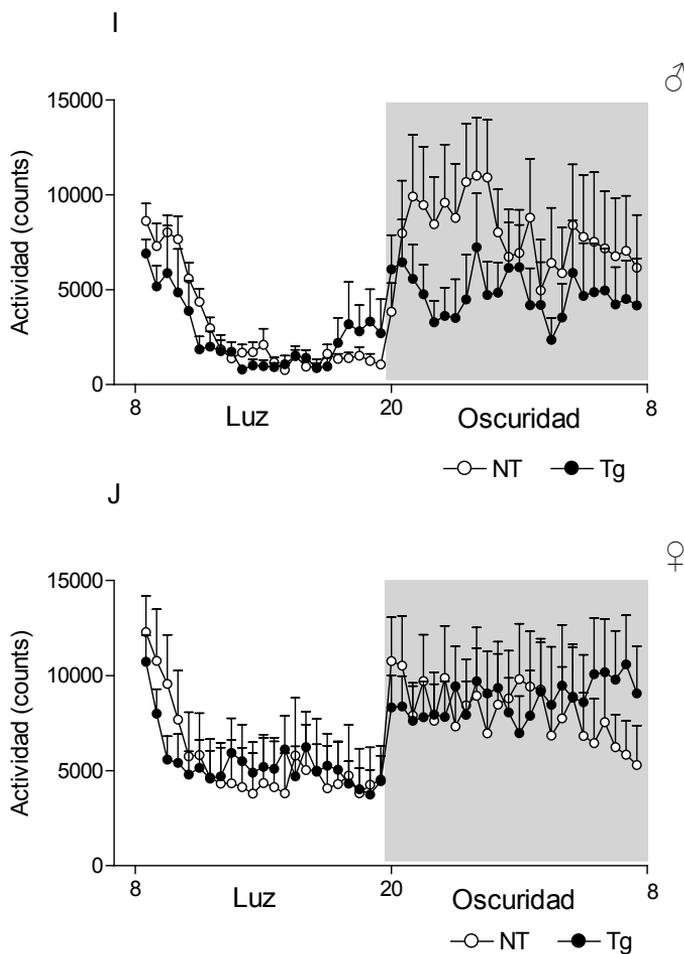


Figura 4.7. I y J) Actividad locomotora a lo largo del ciclo luz-oscuridad (24 horas) en animales de 15 meses de edad. Resultados mostrados en *counts*.

En la tabla 4.4 se muestra la evolución del peso de los animales correspondiente al periodo de 24 horas de duración de la prueba de actividad motora basal. Están representados los diferentes grupos experimentales, desde los 2 meses hasta los 15 meses de edad. Era esperable que el efecto del aislamiento y la exposición a la novedad durante 24 horas provocase pérdidas de peso en los ratones.

El análisis estadístico MANOVA muestra que los animales perdieron peso entre la primera medida (antes del inicio del test de actividad de 24 h) y la segunda, tomada justo al sacar los animales de las cajas de actividad (efecto “día”, $F_{(1,252)}=343.1$ $p<0.001$), pero que tal pérdida de peso fue relativamente mayor en los ratones 3xTgAD (lo muestra la interacción “día x genotipo”, $F_{(1,252)}=13.5$ $p<0.001$). Aparece también una interacción “día x edad”, ($F_{(4,252)}=2.4$ $p<0.047$), indicativa de que hay una tendencia consistente a que la pérdida de peso durante las 24 horas del test de actividad sea inferior en la edad más joven (2 meses) que en edades más avanzadas (ver Tabla 4.4).

En relación a efectos “entre grupos”, el MANOVA mostró también efectos del sexo ($F_{(1,252)}=54.2$, $p<0.001$; las hembras pesan menos), del genotipo ($F_{(1,252)}=29.7$, $p<0.001$; los ratones transgénicos pesan más), de la edad ($F_{(4,252)}=43.8$, $p<0.001$; los ratones ganan peso con la edad), de la interacción “sexo x genotipo” ($F_{(1,252)}=10.8$, $p=0.001$; el incremento global de peso que presentan los ratones transgénicos -respecto a los NTg- es más pronunciado en los machos) y de la interacción “sexo x edad” ($F_{(4,252)}=5.9$, $p=0.001$), dado que, a medida que avanza la edad, las hembras tienden a alcanzar valores de peso similares a los machos (ver valores medios de peso entre machos y hembras a los 2 y a los 15 meses de edad en Tabla 4.4).

Tabla 4.4. Evolución del peso de los animales durante 24 horas de la prueba de actividad locomotora basal.

	2 m		6 m		9 m		12 m		15 m	
	NT	Tg								
MACHOS	<i>n=14</i>	<i>n=14</i>	<i>n=14</i>	<i>n=14</i>	<i>n=12</i>	<i>n=12</i>	<i>n=12</i>	<i>n=15</i>	<i>n=12</i>	<i>n=14</i>
Peso inicio (g)	27.8 ±0.7	31.4 ±1.3	33.2 ±0.8	42.6 ±1.7	36.4 ±1.4	41.5 ±2.2	35.0 ±1.7	43.7 ±1.3	34.5 ±1.1	36.6 ±1.7
Peso final (g)	27.1 ±0.6	30.2 ±1.1	33.4 ±0.1	41.2 ±1.6	35.0 ±1.2	39.9 ±2.1	34.9 ±1.4	42.3 ±1.3	33.8 ±0.9	34.8 ±1.7
HEMBRAS	<i>n=14</i>	<i>n=14</i>	<i>n=14</i>	<i>n=12</i>	<i>n=12</i>	<i>n=12</i>	<i>n=12</i>	<i>n=12</i>	<i>n=14</i>	<i>n=13</i>
Peso inicio (g)	22.9 ±0.7	22.9 ±0.6	28.7 ±1.1	30.3 ±1.1	35.0 ±1.6	35.4 ±2.3	35.9 ±1.1	37.1 ±2.0	34.1 ±1.7	39.5 ±1.9
Peso final (g)	22.2 ±0.5	22.2 ±0.6	27.4 ±1.0	28.5 ±1.0	32.9 ±0.5	34.0 ±2.1	34.1 ±1.1	35.3 ±1.6	32.8 ±1.5	37.9 ±1.9

4.3. DISCUSIÓN ESTUDIO I

4.3.1. Funciones sensorimotoras en el ratón 3xTgAD

Se realizaron pruebas sensorimotoras dentro de una batería estandarizada para valorar las habilidades motoras y la condición física del animal, a través de la capacidad de equilibrio y de coordinación motora, así como de la fuerza de agarre y la resistencia a una serie de las barras (Escorihuela *et al.*, 1995c; Giménez-Llort *et al.*, 2002). De esta manera podemos asegurar que no existen interferencias en los resultados obtenidos en el estudio de actividad circadiana por problemas motores o visuales por parte de los animales. En esta batería sensorimotora nuestros animales transgénicos muestran unas capacidades tanto visuales, como prensiles y de equilibrio, idénticas o superiores a sus respectivos controles. Resultados similares ya han sido observados anteriormente en nuestra colonia de ratones (García *et al.*, 2011; Giménez-Llort *et al.*, 2007 y 2010). En cambio, sí que aparecen diferencias sensorimotoras relacionadas con la edad en ambos genotipos, disminuyendo las capacidades a medida que los animales son más viejos (Lalonde y Strazielle, 2009). Pero siempre mostrando los animales transgénicos unas capacidades similares o superiores a sus controles NTg. Es importante comentar las diferencias sexuales que se encuentran en el estudio, que indican que las hembras presentan un mayor equilibrio en el test de la barra metálica (test de mayor dificultad), así como también una mayor resistencia o fuerza de agarre en el test de la percha metálica respecto a los machos. Esto es consistente con resultados de otros estudios realizados en nuestro laboratorio (Giménez-Llort *et al.*, 2010).

En cualquier caso, los resultados de estas pruebas de “control” sensorimotor, indican que las diferencias en actividad durante el ciclo circadiano, que como veremos a continuación presentan los ratones 3xTgAD a diferentes edades respecto a los animales NTg, no son debidas a posibles anomalías sensorimotoras, sino que más probablemente se deban a características

relacionadas con su misma alteración genética. Lo mismo cabe decir de los resultados del “Estudio II”, que discutiremos en próximas secciones, y que presumiblemente tampoco puedan ser debidos a diferencias sensorimotoras “gruesas” entre los ratones de ambos genotipos.

4.3.2. Respuestas de neofobia o inhibición conductual ante la novedad en el ratón 3xTgAD: Test de las esquinas

El test de neofobia nos indica temor por lugares o elementos nuevos, y ya se han observado resultados similares en esta misma cepa de ratones transgénicos (Arranz *et al.*, 2009; Giménez-Llort *et al.*, 2007 y 2010,). Esta conducta neofóbica incrementada es una característica común a muchos ratones transgénicos de APP descritos en la literatura (Janus y Westaway 2001). Encontramos que tanto machos como hembras 3xTgAD presentan sistemáticamente niveles superiores de la conducta de neofobia al compararlos con sus respectivos controles NTg. Esto indica que los transgénicos 3xTgAD presentan una mayor inhibición conductual para explorar las esquinas, así como también una reducción de la exploración vertical (levantamientos o *rearings*)(Giménez-Llort *et al.*, 2007 y 2010). Esta conducta también muestra una relación con la edad, siendo menor, a medida que los animales son más viejos.

Es interesante comentar, que los efectos observados en el test de neofobia (*Corner* test) tengan el mismo sentido que en la medida de actividad circadiana, en particular por el efecto del “genotipo” y por las similitudes que se pudiesen establecer entre el factor “respuesta a la novedad” del *Corner* test y de los primeros 30 minutos de exposición a la caja (nueva) del test de actividad circadiana (ver sección siguiente). Aún así, hay que señalar que ambas medidas de actividad en respuesta a la novedad no presentan correlación entre ellas. De hecho, hemos realizado correlaciones de *Pearson* entre las medidas de ambos test y los coeficientes obtenidos son de entre $r = -0.095$ y $r = -0.014$,

dependiendo de si se incluyen sólo los animales no transgénicos (controles) o bien toda la muestra.

4.3.3. Ritmos circadianos de actividad basal y evolución del peso corporal a diferentes edades en ratones 3xTgAD

Ritmos de actividad espontánea

El objetivo de este estudio fue detectar las alteraciones en el comportamiento locomotor espontáneo de los ratones 3xTgAD y evaluar las analogías posibles con los "síntomas conductuales y psicológicos de la demencia"(SCPD). De hecho, los trastornos del sueño son una manifestación clínica de la EA, con despertares frecuentes en la noche y un incremento de la propensión a dormir durante el día, razón principal para la institucionalización de los pacientes con EA (Satlin *et al.*, 1995; Volicer *et al.*, 2001). Es interesante observar que los pacientes con Alzheimer muestran menos actividad locomotora en la fase diurna, pero más en la fase nocturna que los controles sanos (Harper *et al.*, 2004). Esta fragmentación del sueño puede implicar importantes consecuencias en los procesos de memoria (Graves *et al.*, 2001).

Como factores que podrían contribuir a la fisiopatología de las perturbaciones del ritmo circadiano en la EA, se han hipotetizado: 1) una disminución de la secreción de melatonina (Mishima *et al.*, 1999); 2) alteraciones de neurotransmisores en el hipotálamo (Sparks *et al.*, 1988); 3) cambios funcionales del núcleo supraquiasmático (Swaab *et al.*, 1996); 4) reducción de la vasopresina (Swaab *et al.*, 1985, 1996); 5) procesos fisiopatológicos típicos relacionados con la EA, como la acumulación progresiva de B-amiloide, la placa β A y la pérdida de células neuronales (Mattson, 2004).

Es importante recordar que la fase activa de los ratones sucede durante la fase de oscuridad (esto es, cuando se apaga la luz), al contrario que en los seres

humanos. En el estudio de ritmos circadianos de actividad a diferentes edades, se han observado como principales resultados, los siguientes:

- 1) Globalmente, teniendo en cuenta las 24 h, los ratones 3xTgAD muestran una tendencia ($p < 0.063$) a presentar menor actividad que los animales no transgénicos. Dicha tendencia es claramente significativa si se observan los valores de actividad durante las primeras 5 horas de la fase de luz.
- 2) Ambos genotipos presentan una mayor actividad durante la fase oscura.
- 3) Tan solo aparece un efecto asociado al sexo durante los primeros 30 minutos de la fase de oscuridad, siendo las hembras NTg las que presentan una mayor actividad.
- 4) Es notable, que los ratones transgénicos, a través de todas las edades, manifiestan una mayor inhibición conductual ante la novedad, como pone de manifiesto el hecho de que presenten significativamente menor actividad que los no transgénicos durante los primeros 30 minutos de exposición a las cajas de medida de actividad.

Durante las primeras horas de exposición al test, en fase de luz, todos los animales tanto jóvenes como adultos presentan un pico en la actividad. Esta hiperactividad inicial se va reduciendo con el paso del tiempo y se debe a la conducta exploratoria provocada por la novedad y al proceso de habituación gradual típico de la conducta en ambientes desconocidos (Galani *et al.*, 2001; Ganea *et al.*, 2007; Tang y Sanford 2005).

A pesar de que el patrón circadiano de actividad motora espontánea (durante 24 horas) es similar entre ambos grupos, los animales 3xTgAD muestran una menor actividad global respecto al grupo control NTg. Y esta diferencia es significativa durante las primeras 5 horas de exposición al test durante la fase de luz. Otros estudios, con este mismo modelo 3xTgAD, muestran como machos transgénicos de 2 y 6 meses de edad presentan una tendencia a la

disminución en la actividad circadiana total, producto de que tal tendencia aparece tanto en fase diurna como en fase nocturna respecto al ratón NTg (Giménez-Llort *et al.*, 2007; y datos no publicados). Incluso animales 3xTgAD de 12 meses de edad presentan una menor actividad durante la primera hora de la fase diurna (Giménez-Llort *et al.*, 2007). Un estudio similar realizado con este mismo modelo transgénico, pero midiendo la actividad en una rueda durante 10 días consecutivos, muestra que los animales 3xTgAD presentan una disminución en el porcentaje de actividad nocturna (fase activa) respecto a sus animales controles (Sterniczuk *et al.*, 2010a). Este efecto es comparable con lo que sucede en la EA en humanos.

El caso más acusado de hipoactividad que encontramos en nuestro estudio, ocurre en las hembras transgénicas de 6 meses de edad, justo la etapa de la enfermedad en la que se ha descrito que por primera vez aparece inmunoreactividad de la β A a nivel extracelular, déficit sináptico de LTP (Oddo *et al.*, 2003a) y déficits de aprendizaje/memoria (Billings *et al.*, 2005; Giménez-Llort *et al.*, 2007). Estas hembras muestran una hipoactividad muy marcada respecto a su grupo control no solo en la fase oscura, sino que se mantiene durante las 24 horas del ciclo.

Podríamos considerar que en general nuestro estudio todos los grupos muestran un ritmo circadiano bien definido, en donde el mayor pico de actividad se presenta durante la fase de oscuridad. Este patrón de la actividad lo podríamos definir como dentro de la normalidad (Ganea *et al.*, 2007).

Estudios similares, en ratones APP23, muestran cómo mientras en ratones jóvenes (3 meses) y adultos (6 meses) no se encuentran diferencias en actividad durante la fase de oscuridad, los ratones transgénicos heterocigotos de edad avanzada (12 meses) muestran hiperactividad durante la fase oscura en comparación con su grupo control (Vloeberghs *et al.*, 2004), demostrando una alteración del patrón de actividad locomotora circadiana dependiente de la edad en este modelo APP23.

En la literatura, encontramos resultados muy variados e incluso contradictorios respecto a los ciclos circadianos en ratones transgénicos usados como modelos de EA. Muchos modelos presentan un efecto de hipoactividad en la fase oscura por parte del ratón transgénico, como es el caso del modelo que expresa una β -APP₇₅₁ humana, que tanto a los 6 meses como a los 12 meses de edad (el déficit de aprendizaje en este modelo tan sólo se observa a partir de los 12 meses) presentan esta menor actividad (D'Hooge *et al.*, 1996; Moran *et al.*, 1995). Otro estudio muestra que estos mismos ratones, homocigotos para APP₇₅₁, presentan valores de hiperactividad entre los 3-5 meses de edad, que disminuyen (especialmente la actividad nocturna) en edades más avanzadas hasta alcanzar los niveles de los animales “control” no transgénicos (Huitron-Resendiz *et al.*, 2002). Incluso dentro de un mismo modelo se pueden encontrar resultados opuestos, como el hallado en hembras transgénicas para APP23, que a los 6 y 16 meses presentan hipoactividad, mientras que a la edad de 24 meses presentan hiperactividad (Lalonde *et al.*, 2002, 2003a). En cambio otro estudio sobre este mismo modelo de APP23 ha observado una hiperactividad nocturna a los 6 meses de edad (Van Dam *et al.*, 2003), mientras que los mismos ratones son menos activos que sus controles cuando se encuentran en un ambiente nuevo.

Otro ratón transgénico, con la doble mutación APP/PS1, también muestra hipoactividad respecto a su control (Pugh *et al.*, 2007). Esta hipoactividad fue evidente tanto en entornos familiares como desconocidos, y esto sugiere que sus niveles de actividad siguen siendo inferiores a los animales control independientemente del nivel de novedad. Por lo tanto, en este caso, la familiaridad con el entorno no tiene ningún efecto sobre su fenotipo conductual.

Como hemos visto hasta ahora, numerosos estudios han evaluado la actividad locomotora en modelos de ratón con sobreexpresión de APP o APP/PS1 (Kawasumi *et al.*, 2004; King y Arendash 2002; King *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2004; Ognibene *et al.*, 2005; Touma *et al.*, 2004b), y reflejan la dificultad de determinar el efecto preciso de la sobreexpresión de la APP sobre la actividad

de los animales. Esta inconsistencia, de los resultados previamente descritos, podría ser atribuida a variaciones en la construcción del transgénico como, por ejemplo, el tipo de cepa utilizada como control, así como el propio APP mutado y las diferencias en el nivel de expresión o selección del promotor. Sin olvidar otro de los factores importantes sobre los efectos de las manipulaciones genéticas, que sería el sexo del animal. Otros autores refuerzan esta teoría, y contribuyen a la idea de que esta diversidad de resultados, de hipoactividad e hiperactividad, que refleja la literatura sobre el mismo tipo de modelo de animal, se debe a las diferencias de edad, la dimensión de los aparatos que se utilizan, la duración de la prueba y, evidentemente, al fondo o *background* genético (Dumont *et al.*, 2004)

El *background* genético es uno de los determinantes más importantes de la conducta en muridos (Gerlai, 1996). La influencia de la procedencia genética (que determina el que será el *background* o “fondo” genético) puede enmascarar o potenciar sustancialmente el efecto de la manipulación genética, bien sea en modelos de sobreexpresión génica (transgénicos) o en modelos de silenciamiento (*knockouts*). Así que, es posible que los diferentes fenotipos producidos por la sobreexpresión del mismo gen en los diferentes modelos transgénicos encontrados en la bibliografía, sean debidos a diferencias del fondo genético (Crawley *et al.*, 1997; Pugh *et al.*, 2004).

Se sabe que el fenotipo de un ratón mutante o transgénico no es sólo el resultado del gen sobreexpresado, sino que también refleja la interacción de la mutación con los genes del *background* genético, con los productos de los mismos, así como de ambos (genes y/o productos) y el ambiente (Crabbe *et al.*, 1999; Crawley *et al.*, 1997; Gerlai, 1996). Las proteínas no producen sus efectos aisladamente, sino incorporadas en complejas cascadas bioquímicas, en las que cada reacción es directamente dependiente de muchas otras reacciones moleculares simultáneas. Por tanto, la caracterización fenotípica de ratones transgénicos y la interpretación correcta de los efectos de la manipulación genética se ha de realizar considerando el perfil conductual de

las cepas parentales. Es importante no olvidar que en nuestro modelo se insertan 3 genes diferentes, y es probable que la interacción de los mismos con múltiples genes específicos del *background* genético sea lo que finalmente produce un fenotipo determinado.

Además de los efectos genéticos, que indudablemente juegan un papel crucial en el comportamiento que podemos observar en nuestros animales, también es necesario no olvidar la importancia que puede ejercer el efecto ambiental sobre la conducta. Algunos autores explican que la diversidad de resultados en la actividad motora que encontramos en la literatura, incluso en un mismo modelo animal, se debe a las condiciones ambientales específicas de cada laboratorio (Crabbe *et al.*, 1999; Wahlsten *et al.*, 2003).

Un estudio realizado en tres laboratorios diferentes, con ocho cepas consanguíneas de ratón y en cinco pruebas de comportamiento e intentando realizar el mismo procedimiento experimental, obtuvo diferencias significativas (e incluso efectos contrarios) en algunas de las conductas estudiadas en función del laboratorio. Esto sugiere que las diferencias en los resultados pueden ser debidas a las condiciones ambientales específicas de los distintos laboratorios, y algunos de los efectos específicos de comportamiento podrían no ser atribuidos a las manipulaciones/características genéticas. Por este motivo es importante, si es posible, que los genotipos sean probados en diferentes laboratorios y evaluados con múltiples pruebas de conducta antes de concluir que un gen específico influye en un dominio específico del comportamiento (Crabbe *et al.*, 1999, 2003; Wahlsten *et al.*, 2003; Wolfer y Lipp 2000).

Volviendo a nuestro estudio, cabe decir que en ratones se ha observado que el comportamiento estereotipado ocurre principalmente durante las primeras horas de la fase de oscuridad (Ambree *et al.*, 2006). Este aumento de la actividad locomotora se va reduciendo durante la segunda parte de la fase oscura (en la mayoría de los casos), terminando con unos pocos picos

secundarios. Este patrón o ritmo de actividad diaria se ha descrito en la literatura, y en concreto en la cepa de ratones C57BL/6J (Kopp, 2001; Tang y Sanford, 2005; Vloeberghs *et al.*, 2004), de la que derivan los animales controles y transgénicos utilizados en este estudio (Oddo *et al.*, 2003a). Así que podríamos decir que el patrón observado en nuestros animales entra dentro de la normalidad; incluso los animales control exhiben un patrón del ritmo circadiano variable (Kopp *et al.*, 2001).

En general los autores suelen relacionar los resultados de la alteración en la actividad motora como una reminiscencia de las perturbaciones en actividad y ritmos diurnos observados en pacientes de la EA (Okawa *et al.*, 1991; Van Someren, 2000; Volicer *et al.*, 2001; Witting *et al.*, 1990). En cambio, en nuestro estudio no hemos hallado resultados concluyentes que presenten similitudes con el patrón que se presenta en humanos.

Cambios en el peso corporal

Era esperable que el efecto del aislamiento y la exposición a la novedad durante 24 horas provocase pérdidas de peso en los ratones. Y, curiosamente, tal pérdida de peso fue relativamente mayor en los ratones 3xTgAD.

Las medidas del peso muestran un claro dimorfismo sexual, siendo los machos los que presentan un peso mayor respecto a las hembras, pero a medida que avanza la edad, las hembras tienden a alcanzar valores de peso similares a los machos. Este aumento de peso por parte de los animales 3xTgAD, como las diferencias sexuales, ya se han observado en otros estudios de nuestro laboratorio (Giménez-Llort *et al.*, 2007 y 2010).

Este incremento del peso en los animales 3xTgAD, llegando a un punto máximo y después disminuyendo con la edad, sigue la línea que observamos en la literatura o inclusive en la propia EA, en donde las perturbaciones psicomotoras y en los patrones de la ingesta de alimentos están asociadas con

medidas de deterioro cognitivo y funcional, así como con una disminución del peso corporal (Greenwood *et al.*, 2005). Hay que decir que en modelos animales encontramos toda una serie de resultados controvertidos, desde los que mimetizan las observaciones clínicas de la EA (Lalonde *et al.*, 2002) hasta los que no encuentran ninguna diferencia en el peso de los animales transgénicos y controles (Lalonde *et al.*, 2003a), incluso los que muestran unas diferencias superiores respecto a su control (Lalonde *et al.*, 2003b). Estas discrepancias, halladas en los diferentes modelos de EA, probablemente no sólo dependan del tipo de mutación o de la posición de aminoácido que alberga, sino también de la edad o etapa neuropatológica en que se encuentra el animal.

4.3. Conclusiones del Estudio I

Globalmente, podemos afirmar que:

- Nuestros animales 3xTgAD muestran unas capacidades, tanto visuales, como prensiles y de equilibrio idénticas o superiores a sus respectivos controles a cualquier edad. El envejecimiento, por otra parte, produce un empeoramiento progresivo en varias de las capacidades/medidas sensorimotoras en ambos genotipos.
- Es notable, que los ratones 3xTgAD manifiestan una mayor inhibición conductual ante la novedad en diferentes test, presentando sistemáticamente niveles superiores de respuestas de neofobia (mayor inhibición conductual) al compararlos con sus respectivos controles NTg.
- Respecto a los ritmos circadianos de actividad espontánea, los ratones 3xTgAD muestran una respuesta de hipoactividad en relación a los animales controles no transgénicos. La hipoactividad es especialmente clara durante la primera mitad de la fase de luz.

- A pesar que inicialmente los machos 3xTg_AD presentan un mayor peso corporal que las hembras, a medida que avanza la edad, las hembras tienden a alcanzar valores de peso similares a los machos.
- La exposición a las “cajas de actividad” durante 24 horas provoca una reducción de peso globalmente mayor en los ratones 3xTgAD que en los controles NTg.

Por tanto, por lo que respecta a los procesos sensorimotores “gruesos” (iguales o mejores en los ratones 3xTgAD que en los controles) y a la actividad circadiana (hipoactividad en los ratones 3xTgAD), los resultados no irían en la dirección de que el modelo 3xTgAD reproduzca adecuadamente la sintomatología de la EA humana, mientras que sí sería consistente con la misma el perfil neofóbico de estos ratones transgénicos.

Estudio II

5. ESTUDIO II. EFECTOS DE LA ESTIMULACIÓN POSTNATAL EN ANIMALES DE 4 MESES

5.1. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1.1 Animales

Se utilizaron machos y hembras de las colonias de ratones 3xTgAD homocigotos (Tg) y de no transgénicos C57BL/6J (NT; como cepa control), mantenidos en nuestro laboratorio del Departamento de Psiquiatría y Medicina Legal, del Instituto de Neurociencias de la Universidad Autónoma de Barcelona.

Los animales se evaluaron a los 4 meses de edad. Escogemos esta edad a partir de los estadios neuropatológicos descritos por Oddo et al. (2003a), ya que en esta edad los animales presentan inmunoreactividad a la β A a nivel intraneuronal tanto en hipocampo como en corteza. Asimismo, se obtuvieron resultados similares en la evaluación neuropatológica de la β A intraneuronal por inmunohistoquímica realizada por M. Vivó et al. (2006) en estos mismos animales (ver figura 6.1 en la Discusión general)

Los animales, del mismo genotipo, sexo y tratamiento se mantuvieron en grupos de 2-3 animales, en jaulas de Macrolón (35x35x25 cm), bajo condiciones estándar de laboratorio (agua y comida ad libitum, temperatura de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, humedad a $50\text{-}60\%\pm 10\%$ y ciclo de luz/oscuridad de 12 horas, con inicio de luz a las 08:00h) hasta el momento de la prueba.

Todos los procedimientos experimentales descritos a continuación fueron previamente aprobados por el “Comité de ética para la experimentación animal y humana” de la Universidad Autónoma de Barcelona (CEEAH), y toda la investigación se llevó a cabo bajo la legislación Española sobre “Protección de

animales utilizados para la experimentación y otros fines científicos” y de conformidad con la Directiva de la Unión Europea (UE 08-88) sobre este tema.

5.1.2. Estimulación postnatal

El día 0 es el día del nacimiento de las crías, así que en el día 1 postnatal se inició el tratamiento de estimulación postnatal (EP). La EP consistió en retirar la madre de la camada y separar las crías entre ellas, dos veces al día, durante 8 minutos en cada sesión (primera sesión por la mañana entre las 09:00 y las 10:00 horas y la segunda sesión a la tarde entre las 16:00 y las 17:00 horas, con un intervalo mínimo entre sesiones de unas 7 horas) y durante los primeros 21 días postnatales (coincidiendo con el día del destete; descrito por Escorihuela *et al.*, 1994b; Fernández-Teruel *et al.*, 1991; ver evolución por edades en Fig. 5(I)). El tratamiento se realizó fuera del estabulario, en una sala contigua, y bajo condiciones de temperatura controlada para evitar posibles efectos negativos de hipotermia.

En las dos sesiones diarias se colocaron las crías individualmente en cajas de plástico con un papel y cada cría se estimuló individualmente a través de suaves masajes (durante 3-4 segundos) con el dedo pulgar del experimentador, realizando movimientos repetitivos desde la cabeza hasta la cola del animal. En cada sesión de 8 minutos se realizan tres manipulaciones (al coger el animal o minuto “0”, al minuto “4” y al minuto “8”). Al finalizar el tratamiento las crías se devuelven a la jaula original y una vez está la camada completa devolvemos a la madre. Pesamos a las crías el primer día del tratamiento, o día 1, y el día 21 al finalizarlo (previo al destete). Este control del peso también se realiza en los grupos no tratados. Estos animales, no tratados, no son perturbados durante este período postnatal a excepción de los cambios rutinarios de viruta semanales.

Por tanto, tenemos 4 grupos experimentales por cada sexo (con un número total de 107 animales):

Ratones 3xTgAD con EP, (Tg-EP). n= 11♂-12♀

Ratones 3xTgAD sin tratamiento (Tg). n= 14♂-14♀

Ratones no transgénicos con EP (NT-EP) n= 14♂-14♀

Ratones no transgénicos sin tratamiento (NT) n= 14♂-14♀



Figura 5(I). Diferentes edades durante el transcurso del tratamiento de estimulación postnatal

5.1.3. Estudios conductuales

La batería utilizada para el fenotipado conductual está basada en trabajos previos de nuestro laboratorio (Escorihuela *et al.*, 1995c, Giménez-Llort *et al.*, 2002, 2007 y 2011). Esta batería consiste en una serie de pruebas conductuales clásicas para la caracterización de perfiles cognitivos y conductuales en roedores.

La batería conductual (ver Tabla 5(I)), se inicia con el test de neofobia o test de las esquinas (“*corner test*”, CT), continúa con el estudio de capacidades de aprendizaje y memoria espacial en el laberinto acuático de Morris (“*morris water maze*”, MWM), seguido de pruebas clásicas como el campo abierto (CA), el laberinto en cruz elevado (“*Plus maze*”, PM), la tabla de 16 agujeros de Boissier (“*Boissier’s 16-hole board*”, HB), y la caja blanca/negra (“*Dark-light box*”, DLB), que permiten evaluar patrones de respuesta conductual que incluyen conducta exploratoria y de emotividad/ansiedad o miedo. También se estudia el patrón de actividad espontánea circadiana durante 24 horas (“*Actimeter test*”, ACT), así como la actividad exploratoria en condiciones más

etológicas a través del laberinto hexagonal en túnel (“*Hexagonal Tunnel Maze*”, TM) (ver Tabla 5(I)).

Los experimentos se llevaron a cabo en días consecutivos, siempre durante el rango horario de las 10 a las 13 horas, contrabalanceando por genotipo, sexo y tratamiento, y en 4 tandas experimentales. Los animales fueron pesados al inicio de cada test. Los estudios se llevaron a cabo según la ley 86/609/EEC y siguiendo las directrices de la Comisión ética de la UAB, que hace referencia al cuidado de los animales durante el proceso de experimentación.

Tabla 5(I). Cronología de la batería conductual del Estudio I.

TEST	C	PT ₁	PT ₂	PT ₃	PT ₄	RM ₂	CUE	CA	PM	H	DLB	ACT	TM
	T				RM ₁					B			
DIA	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	19

CT; “*Corner test*”. PT1-PT4; “*Place task*” días 1-4. RM1-RM2; “*Prove test*” o “*Removal*” 1-2. CUE; “*Cue task*”. CA; Campo abierto. PM; Laberinto en cruz elevado. HB; “*Boissier’s 16 hole board*”. DLB; “*Dark-light box test*”. ACT; “*Actividad espontanea circadiana*”. TM; “*Hexagonal tunnel maze*”.

5.1.3.1. Test de Neofobia o *Corner test*

El Test de Neofobia o *Corner test* (CT) consiste en introducir al animal en el centro de una jaula de plástico estándar (tipo Macrolón) con viruta limpia y sin olores, durante 30 segundos (ver fig. 5(II)). Este test se realiza aprovechando los cambios semanales de viruta y haciéndolo coincidir con las edades de 2, 3 y 4 meses de estos animales. Así, se pueden ya evaluar efectos en este test durante la estabulación de los animales y antes de empezar la batería conductual propiamente dicha. En esta prueba se evalúa el número de esquinas (*corners*) explorados por el animal (el animal tiene que oler y explorar la esquina aunque sea durante escasos segundos) y el número de “*rearings*” o levantamientos verticales realizados durante 30 segundos (Arranz et al., 2009; Garcia et al., 2011; Giménez-Llort et al., 2007, 2010).



Figura 5(II). Prueba de las esquinas o *Corner test*.

5.1.3.2. Laberinto acuático de Morris

El posible déficit cognitivo en el aprendizaje y memoria espacial fue evaluado a través del laberinto acuático de Morris (MWM), en 2 paradigmas o tareas que dependen fundamentalmente de la integridad de la función del hipocampo, área diana afectada en la EA. Los animales fueron entrenados para localizar la plataforma sumergida (7 cm de diámetro) en una piscina circular (71 cm de diámetro y 20 cm de profundidad de agua opaca a 24°C) situada en una sala negra con diversas señales visuales en las paredes que ayudan al animal a orientarse y recordar donde se encuentra la plataforma (Escorihuela et al., 1995c, 1998; Morris 1981,1984; Whishaw, 1995; Wolfer et al., 1998, ver fig. 5(III)). Los animales que no encuentran la plataforma durante los 60 segundos de la prueba, se situaron encima de la plataforma durante 15 segundos, el mismo periodo que los animales que lo conseguían. Todas las sesiones o ensayos fueron grabados y analizados por el sistema de análisis computerizado SMART (Panlab S.L, Barcelona, Spain).

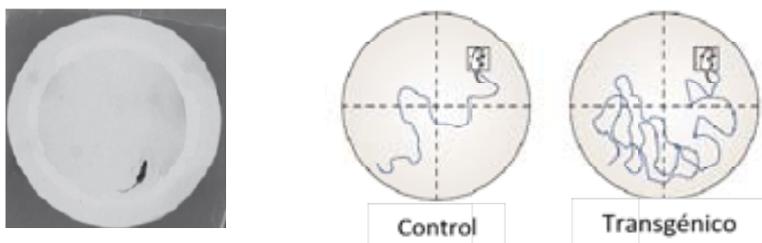


Figura 5(III). Laberinto acuático de Morris y trayectoria representativa realizada por cada genotipo

Días 1-4, *Tarea de aprendizaje espacial de referencia o “Place task” (PT).*

La denominaremos también tarea de adquisición espacial. El ratón se coloca en la piscina (orientado hacia la pared) desde los puntos de salida escogidos al azar (orientación norte “N”, sur “S”, este “E” y oeste “W”) y tiene que aprender a localizar la plataforma (sumergida a 1,5 cm debajo del agua y situada en el centro del cuadrante SW), en un tiempo máximo de 60 segundos por ensayo (ver Fig. 5(IV)). Los animales que no hallaron la plataforma durante este tiempo, se colocaron sobre la plataforma durante 15 segundos.

Se realizaron 4 ensayos por día con un intervalo entre ensayos de 15 minutos. Esta prueba se repitió durante 4 días, y la capacidad de recordar la localización de la plataforma se evaluó midiendo la latencia o tiempo que tarda el animal en llegar a la plataforma, la distancia recorrida y la velocidad de natación.

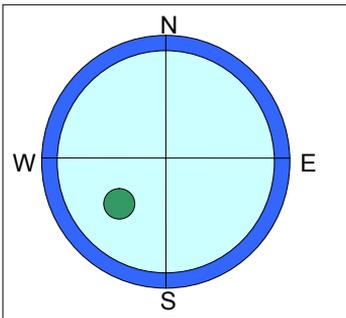


Figura 5(IV). Posición de la plataforma durante la tarea de adquisición.

Día 4: *Test de memoria sin plataforma, a la 1:30 horas tras la adquisición (“Probe test” o “Removal”, RM 1:30h).*

Una hora y media después de finalizar el último ensayo de la tarea de adquisición del cuarto día, se evaluó la capacidad de retención a corto plazo (memoria a corto plazo). La plataforma se extrae de la piscina y el animal, se

libera desde el cuadrante opuesto de donde se encontraba la plataforma. Se realiza un ensayo de 60 segundos de duración (ver Fig. 5(V)).

La capacidad de retención o memoria a corto plazo se evaluó por el número de “cruces a través de la posición donde se hallaba la plataforma” (CP; o “*annulus crossings*”), o por las correspondientes posiciones en los otros cuadrantes de la piscina, así como el porcentaje de preferencia ($(CP \times 100) / \text{total de cruces por todas las posibles posiciones de la plataforma}$). También se evaluaron las trayectorias o distancias recorridas en el cuadrante donde se hallaba la plataforma (DIST-P) y en cada uno de los otros 3 cuadrantes, así como la variable de preferencia según la fórmula “ $(DIST-P \times 100) / \text{total DIST recorrida en todos los cuadrantes}$ ”. También se evaluó la distancia y la velocidad recorrida desde el inicio del test hasta el primer cruce por la posición donde se hallaba la plataforma.

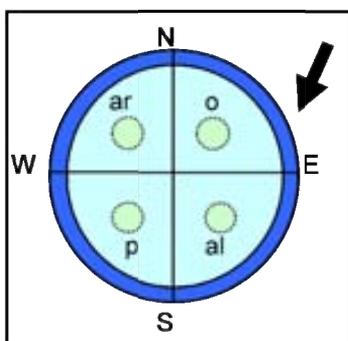


Figura 5(V). Dibujo esquemático de las posiciones imaginarias de la plataforma en los diferentes cuadrantes, durante la prueba de retención. “p” posición de la plataforma, “o” posición opuesta a la plataforma, “ar” posición adyacente a la derecha de la plataforma, “al” posición adyacente a la izquierda de la plataforma

Día 5: *Test de memoria sin plataforma a las 24 horas tras la adquisición (RM 24h).*

Para la evaluación de la memoria o capacidad de retención a largo plazo, se volvió a repetir el ensayo sin plataforma 24 horas después de la última sesión de adquisición. En esta prueba se vuelven a evaluar el número de “cruces a través de la posición donde se hallaba la plataforma” (CP; o “*annulus*

crossings”), y por las correspondientes posiciones en los otros cuadrantes de la piscina, así como el porcentaje de preferencia $((CP \times 100) / \text{total de cruces por todas las posibles posiciones de la plataforma})$. También se evaluó la trayectoria o distancia recorrida tanto en el cuadrante donde se hallaba la plataforma (DIST-P) como en cada uno de los otros 3 cuadrantes, así como la variable de preferencia según la fórmula $((\text{DIST-P} \times 100) / \text{total DIST recorrida en todos los cuadrantes})$ ”.

Día 6: *Aprendizaje guiado por señales locales* o “*Cued task*” (CUE).

En esta tarea se coloca la plataforma visible (que sobresale 1 cm por encima del agua) y se señala con una bandera (con rallas de color blanco y negro, de $5 \times 8 \times 15$ cm) que sirve como señal o estímulo visual externo. La plataforma con la bandera se sitúan en el cuadrante NW al de la tarea de adquisición. Se realizan 4 ensayos con entradas al azar (por los 4 puntos cardinales, N, S, E, O), con intervalos de 15 minutos entre ellos y se evalúa la distancia recorrida hasta hallar la plataforma y la velocidad de natación. De esta manera, se descarta la posibilidad de problemas visuales, motivacionales o motores “gruesos” de los animales.

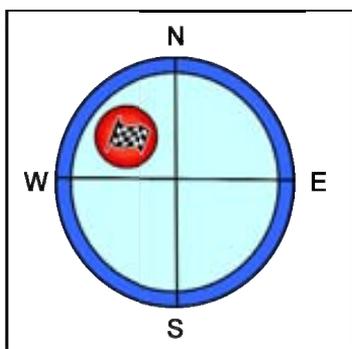


Figura 5(VI). Posición de la plataforma con la bandera, durante la prueba de la “CUE”.

5.1.3.3. Prueba del Campo abierto

El test del Campo Abierto (CA) es una prueba clásica de las baterías conductuales en la que el animal se expone en un ambiente nuevo, abierto e iluminado (p.ej. Crawley 1985; Walsh y Cummins 1976). Su conducta en este espacio está determinada por el equilibrio entre el interés por la novedad (conducta exploratoria) natural de los animales y el miedo a los espacios desconocidos, abiertos e iluminados (emotividad /ansiedad). El aparato consiste en una caja de madera blanca (55 x 55 x 25 cm de altura) con 25 cuadrados dibujados en la base que permiten contabilizar los desplazamientos horizontales del animal (ver Fig. 5(VII)).

El ratón se coloca en el centro del aparato y se observa su conducta durante 5 minutos. Las variables que medimos son los desplazamientos horizontales o actividad exploratoria horizontal (CA-deam; deambulación), la conducta exploratoria vertical (CA-rear; levantamientos o “*rearings*”). También se evaluaron conductas relacionadas con la emotividad, como el tiempo de la conducta de petrificación (CA-freez; o “*freezing*”, desde el inicio del test) y el “tiempo de salida del centro” del aparato en dirección a la periferia del mismo (CA-centro). Esta prueba se graba con vídeo-cámara.

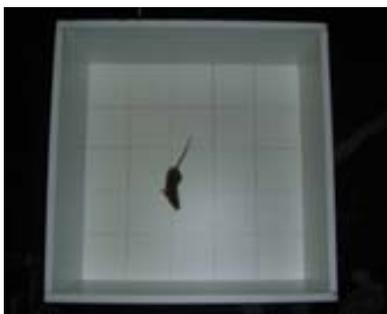


Figura 5(VII). Prueba del campo abierto o CA.

5.1.3.4. Prueba del Laberinto en cruz elevado

El Laberinto en cruz elevado (“Plus Maze”, PM) es uno de los modelos conductuales más utilizado para el estudio de la ansiedad incondicionada en roedores (Pellow *et al.*, 1985, 1986; Rodgers y Dalvi, 1997). Esta prueba se basa en el miedo natural a las alturas y espacios desprotegidos, y es uno de los más utilizados para la validación de fármacos ansiolíticos (Pellow *et al.*, 1985). El aparato está formado por dos brazos abiertos (BA; 30 x 5 cm) y dos brazos cerrados (BC; 30 x 5 x 15 cm, con el suelo y paredes negras) dispuestos en cruz formando un cuadrado de 5 x 5 cm en el centro. El laberinto está elevado a unos 40 cm del suelo y situado en una sala pintada de negro (suelo y paredes). El animal se sitúa en el centro del aparato, encarado hacia uno de los brazos cerrados (siempre la misma orientación), y se observa su conducta durante 5 minutos (ver Fig. 5(VIII)). Este test es grabado por videocámara, y el aparato se limpia con etanol al 5% (v/v, diluido en agua) antes y después de que cada animal pase la prueba. Para evaluar el grado de ansiedad del animal se cuantifican las siguientes variables: el “tiempo de latencia de entrada al brazo abierto” (tiempo que tarda el animal en salir por primera vez al brazo desprotegido), el número de “entradas en los brazos abiertos” (EBA), el número de entradas en los brazos cerrados (EBC; como indicador típico de actividad) y el tiempo transcurrido en los brazos abiertos (TBA). Se calculó asimismo, el “porcentaje de entradas en los brazos abiertos” ($\%EBA = (EBA/EBA+EBC)*100$) y el “porcentaje de tiempo pasado en los brazos abiertos” ($\%TBA = (TBA/TBA+TBC)*100$).



Figura 5(VIII). Prueba del laberinto en cruz elevado o PM.

5.1.3.5. Tabla de 16 agujeros de Boissier

El test de Boissier (HB) es, en concepto, similar a la Tabla de 4 Agujeros o *Hole-Board*, pero de dimensiones más grandes (60 x 60 x 40 cm de altura) y un mayor número de agujeros (16 agujeros equidistantes, de 3 cm de diámetro), en los que puede haber (o no) objetos, con el objetivo de estimular la exploración de los animales (Crawley, 1985; File y Wardill, 1975). En esta prueba, colocamos el animal orientado hacia una esquina de la pared del test y se valora la conducta exploratoria desarrollada por el animal en torno a los agujeros durante 5 minutos (ver Fig. 5(IX)).

Estudiamos el “número total de agujeros explorados” (nHB; veces que el animal explora introduciendo la cabeza dentro del agujero sin objetos) y el tiempo acumulado que el animal pasa explorándolos (“tiempo total de exploración”; tHB). También se contabilizó el porcentaje de exploración de los agujeros que se encuentran en el centro del aparato. Este test es grabado con video-cámara.



Figura 5(IX). Tabla de 16 agujeros de Boissier o HB.

5.1.3.6. Prueba de la Caja blanca/negra

Otro test de ansiedad, muy utilizado en las últimas décadas, es la caja de dos compartimentos, uno blanco/iluminado y otro negro/oscurο (“*Dark-light box*”, DLB) que se fundamenta en la preferencia (etológica) de los roedores

(animales nocturnos) por lugares oscuros y su aversión por los espacios claros o iluminados (Bourin et al., 2003; Chaouloff et al., 1997). Este aparato se utiliza en diferentes versiones dependiendo del lugar en donde colocamos inicialmente el animal (en el compartimento blanco o el negro) o el tipo de iluminación que utilizamos (varios grados). La caja blanca/negra (Panlab, S.L., Barcelona, Spain) está constituida por dos compartimentos (negro, 27 x 18 x 27 cm; blanco, 27 x 27 x 27 cm) separados por una pared de 47 cm de altura que tiene una apertura (7 x 7 cm) en su base, por la que el ratón puede pasar de un compartimento al otro (ver Fig. 5(X)). El aparato está situado en una sala oscura y mientras el compartimento negro no está iluminado, el compartimento blanco está ligeramente iluminado por una luz roja (bombilla de 20W).

Se escogieron estas condiciones de iluminación porque en estudios previos (Johansson *et al.*, 2001; Giménez-Llort *et al.*, 2002 y 2007) se observó que generaban un ambiente de adversidad medio que facilita la entrada de los animales no transgénicos (controles) al compartimento blanco. El sujeto se coloca en el compartimento negro, de espaldas a la apertura, encarado hacia la pared, y se observa durante 5 minutos. El nivel de ansiedad se mide mediante la latencia de entrada (LAT), el número total de entradas (NE), el tiempo pasado (T) y la actividad horizontal (número de cruces) realizada en el compartimento blanco. Este test es grabado por medio de una video-cámara.



Figura 5(X). Prueba de la caja blanca/negra o DLB.

5.1.3.7. Actividad espontánea basal durante 24h

El aparato consiste en una plancha horizontal con dos marcos cuadrados superpuestos, que contienen células fotoeléctricas distribuidas en todo su perímetro, que detectan el movimiento y permiten medirlo de manera automática. La unidad de medida de la actividad es el número de interrupciones de fotocélulas o *counts*. Registramos la actividad motora espontánea horizontal del animal ininterrumpidamente durante todo el periodo del ciclo luz-oscuridad (23:30 horas), utilizando cuatro placas de actimetría idénticas controladas por el programa Actitrack (ver fig. 5(XI); Panlab, S.L, Barcelona).

Una vez se encienden las luces del estabulario (8:30 horas) transportamos a los animales a la sala de la actimetría, registramos el peso y colocamos cada animal individualmente en una jaula con viruta limpia idéntica a la de estabulación, con acceso al agua y comida *ad libitum* durante todo el periodo. La sala se mantiene bajo condiciones estándares de estabulación (temperatura de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, humedad a 50-60% y ciclo de luz/oscuridad de 12 horas, con inicio de luces a las 08:00h)



Figura 5(XI). Prueba de la actividad espontánea basal circadiana ("Actimetría" de 24 horas).

5.1.3.8. Laberinto hexagonal en túnel

En el Laberinto hexagonal en túnel (TM) solo utilizamos 63 animales del total (varios animales de los diferentes grupos habían sido previamente asignados a estudios neuroquímicos). Se distribuyeron de la siguiente manera:

Ratones 3xTgAD con EP (Tg-EP). n= 7♂-12♀

Ratones 3xTgAD sin tratamiento (Tg). n= 6♂-6♀

Ratones no-transgénicos con EP (NT-EP) n= 10♂-10♀

Ratones no-transgénicos sin tratamiento (NT) n= 6♂-6♀

El aparato es un laberinto totalmente cerrado (Escorihuela et al., 1997; Fitzgerald et.al, 1988; Fernández-Teruel et al., 1991,1992b y 1994; Giménez-Llort et al., 2005) con un techo que se puede elevar (esto facilita la limpieza de la superficie y la captura del animal), al cual están adheridas las paredes que conforman los 6 brazos radiales independientes (perímetro de 180 cm, túneles de 5 cm de anchura y 9 cm de altura) conectados a un hexágono central por donde entra el animal (perímetro de 66 cm). De esta forma, los pasillos o brazos quedan totalmente a oscuras durante la prueba (ver Fig. 5(XII)).

La medida de la actividad motora del animal se realiza a través de 42 unidades de fotocélulas de infrarrojo conectadas a un ordenador y colocadas uniformemente en las paredes, permitiendo así detectar en cada momento la posición del animal. Cada brazo radial se ramifica en forma de T y el animal puede escoger entre dos direcciones; a la derecha siempre se encuentra con un brazo muy corto o callejón sin salida y a la izquierda con un brazo mucho más largo. La prueba tiene una duración de 6 minutos por sesión. Los parámetros medidos fueron: la actividad motora o “distancia” recorrida durante los 6 minutos que duró el test, así como el tiempo que tarda el animal en explorar los seis brazos diferentes (Latencia)

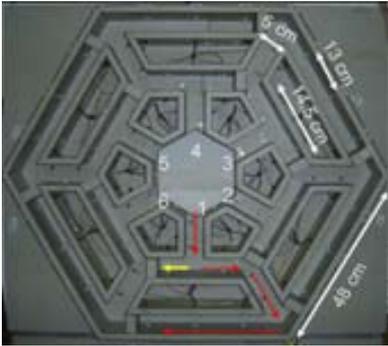


Figura.5(XII). Laberinto hexagonal en túnel (TM).

5.1.4. Análisis estadístico

Los resultados se expresan como media \pm error estándar de la media (SEM) en todas las tablas y figuras. El análisis estadístico se realizó mediante el programa estadístico SPSS (versión 15.0-17.0). Para comparar los diferentes grupos se utilizó el análisis de la varianza (ANOVA), seguido de contrastes *post hoc* mediante la prueba de Duncan cuando del análisis de varianza surgieron interacciones significativas. En el análisis de la varianza con medidas repetidas (MANOVA), cuando no se lograba la esfericidad de Mauchly se utilizó la corrección de Huynh-Feldt. En todos los casos, la significación estadística se consideró a partir de un nivel $p < 0.05$.

5.2. RESULTADOS ESTUDIO II

5.2.1. Pesos

En la Tabla 5.1. están representados los pesos de los diferentes grupos experimentales desde los 2 meses hasta los 5 meses de edad (tiempo que duró la fase experimental del Estudio II).

El MANOVA (2 “genotipo” x 2 “sexos” x 2 “tratamiento” x 4 “edades /medidas de peso”) muestra efectos significativos del factor edad ($F_{(2,05,121.13)}=188.5$, $p < 0.001$), del genotipo ($F_{(1,59)}=19.7$, $p < 0.001$), del tratamiento ($F_{(1,59)}=18.3$, $p < 0.001$) y del sexo ($F_{(1,59)}=72.5$, $p < 0.001$). Tales efectos principales indican que con la edad aumenta el peso, que los ratones transgénicos muestran mayor peso globalmente, que el tratamiento de estimulación postnatal induce un incremento del peso y que los machos pesan más a través de las diferentes edades. Aparecen interacciones significativas de “edad x genotipo”, “edad x tratamiento” y “edad x sexo” (todas las $F_{(2,05, 121.13)} \geq 3.5$, y $p \leq 0.032$ en todos los casos), indicando que el incremento de peso en función de la edad ocurre de forma diferente según sea el genotipo, el tratamiento o el sexo.

Asimismo, se observan efectos “genotipo x tratamiento” ($F_{(1,59)}=11.7$, $p=0.001$) y “genotipo x sexo” ($F_{(1,59)}=5.9$, $p=0.018$). Lo que principalmente indican estas dos interacciones (ver también contrastes de Duncan en Tabla 5.1) es, por una parte, un mayor incremento de peso en los animales 3xTgAD que recibieron estimulación postnatal y, por otra parte, que la diferencia de peso de los ratones 3xTgAD respecto a los no transgénicos es más pronunciada en machos.

Tabla 5.1. Se muestra los pesos de cada grupo desde los 2 meses hasta los 5 meses de edad.

Edad	MACHOS				HEMBRAS			
	No-transgénico		3xTgAD		No-transgénico		3xTgAD	
	Control n=14	EP n=14	Control n=14	EP n=11	Control n=14	EP n=13	Control n=14	EP n=12
2 m	24.7±1.1	25.6±0.6	25.8±0.9	31.0±1.8#	20.1±0.7	21.1±0.4	20.9±0.7	24.0±0.5#
3 m	26.3±1.2	27.5±0.6	28.6±0.7	36.5±2.8#	22.3±0.8	22.7±0.5	22.4±0.5	26.0±0.7#
4 m	28.7±1.0	29.6±0.8	30.4±0.9	39.8±3.1#	24.0±1.2	24.4±0.6	23.0±0.3	28.6±1.0#
5 m	31.2±0.7	32.3±0.7	36.7±1.5	41.2±2.1#	26.1±0.9	27.0±0.7	26.7±0.9	30.3±1.3#

Efecto del tratamiento (EP): # $p < 0.05$ respecto a los animales 3xTgAD no tratados del mismo sexo (Duncan test).

5.2.2. Test de Neofobia o de las esquinas

En la Figura 5.1A-D se representan tanto el número total de esquinas exploradas como la conducta vertical “*rearings*” que realizan los animales durante los 30 segundos que dura el test, y a las 3 edades diferentes en que se administró.

El MANOVA global del total de esquinas exploradas, incluyendo las 3 edades y los dos sexos, muestra efectos significativos de la edad ($F_{(2,118)}=33.5$, $p < 0.001$) y una interacción “genotipo x tratamiento” ($F_{(1,59)}=5.2$, $p=0.025$) (Fig. 5.1A-B). El efecto de la edad es debido a la evidente habituación (disminución del número de esquinas exploradas) que se produce a través de las repeticiones de la prueba, mientras que la interacción “genotipo x tratamiento” mencionada se debe a que la estimulación postnatal muestra una clara tendencia a aumentar el “número de esquinas exploradas” en los ratones 3xTgAD (de ambos sexos) a las tres edades y un efecto globalmente contrario en los animales no transgénicos.

A través de la edad (con las tres repeticiones de la prueba) las hembras muestran un patrón de habituación más consistente que los machos (interacción “sexo x edad”, $F_{(2,118)}=3.3$, $p=0.037$; ver Fig. 5.1A-B).

Aplicando ANOVAs por sexos para estudiar en más detalle alguno de los efectos mencionados, se observa que en el primer test de neofobia, a los 2 meses de edad, aparece un efecto del genotipo ($F_{(1,27)}=6.4$, $p=0.017$) en machos, indicativo de que los no transgénicos exploran más esquinas que los transgénicos (ver test de Duncan en Fig. 5.1A). Asimismo, el correspondiente ANOVA aplicado a los datos de las hembras de 2 meses (primer test de neofobia) indica una interacción “genotipo x tratamiento” ($F_{(1,32)}=7.1$, $p=0.012$; ver también test de Duncan en Fig. 5.1B) que va en idéntico sentido al de la misma interacción (genotipo x tratamiento) que indicaba el MANOVA global arriba mencionado.

El MANOVA global del total de exploraciones verticales o “*rearings*”, incluyendo las 3 edades y los dos sexos, muestra efectos significativos tanto de la edad ($F_{(2,118)}=31.2$, $p<0.001$) como del genotipo ($F_{(1,59)}=41.9$, $p=0.001$) (Fig. 5.1C-D). El efecto de la edad es de nuevo debido a la evidente habituación (disminución del número de exploraciones) que se produce a través de las repeticiones de la prueba, mientras que el efecto del genotipo refleja un aumento global en el número de *rearings* por parte de los animales no transgénicos (Fig. 5.1C-D). El efecto de habituación mencionado (efecto “edad”) es más pronunciado en los ratones no transgénicos y en los ratones sin tratamiento, y ello da lugar a interacciones “genotipo x edad” ($F_{(2,118)}=21.2$, $p<0.001$), “tratamiento x edad” ($F_{(2,118)}=4.8$, $p=0.01$) y “genotipo x tratamiento x edad” ($F_{(2,118)}=5.8$, $p=0.004$).

Asimismo, se observa que el patrón diferente de habituación en función del genotipo (efecto “genotipo x edad” mencionado) varía en función del sexo, lo que genera una interacción “genotipo x sexo x edad” ($F_{(2,118)}=3.7$, $p=0.028$; Fig. 5.1C-D). Un análisis más pormenorizado de la primera prueba de neofobia (a los 2 meses de edad), mediante ANOVAs aplicados a ambos sexos por

separado, muestra efectos globales del genotipo en ambos sexos (machos: $F_{(1,27)}=24.9$ $p<0.001$; hembras: $F_{(1,32)}=49.0$ $p<0.001$), indicando que los ratones 3xTgAD presentan claramente menor actividad vertical (*rearings*) que los no transgénicos (ver también tests de Duncan en Fig. 5.1C-D). En las hembras, en particular, se produce además una interacción “genotipo x tratamiento” ($F_{(1,32)}=4.5$, $p=0.042$, Fig. 5.1D) que, igual que ocurría en la medida de “número de esquinas” (ver arriba y Fig. 5.1B), indica que el tratamiento de estimulación postnatal reduce la conducta vertical en los ratones (hembra) no transgénicos.

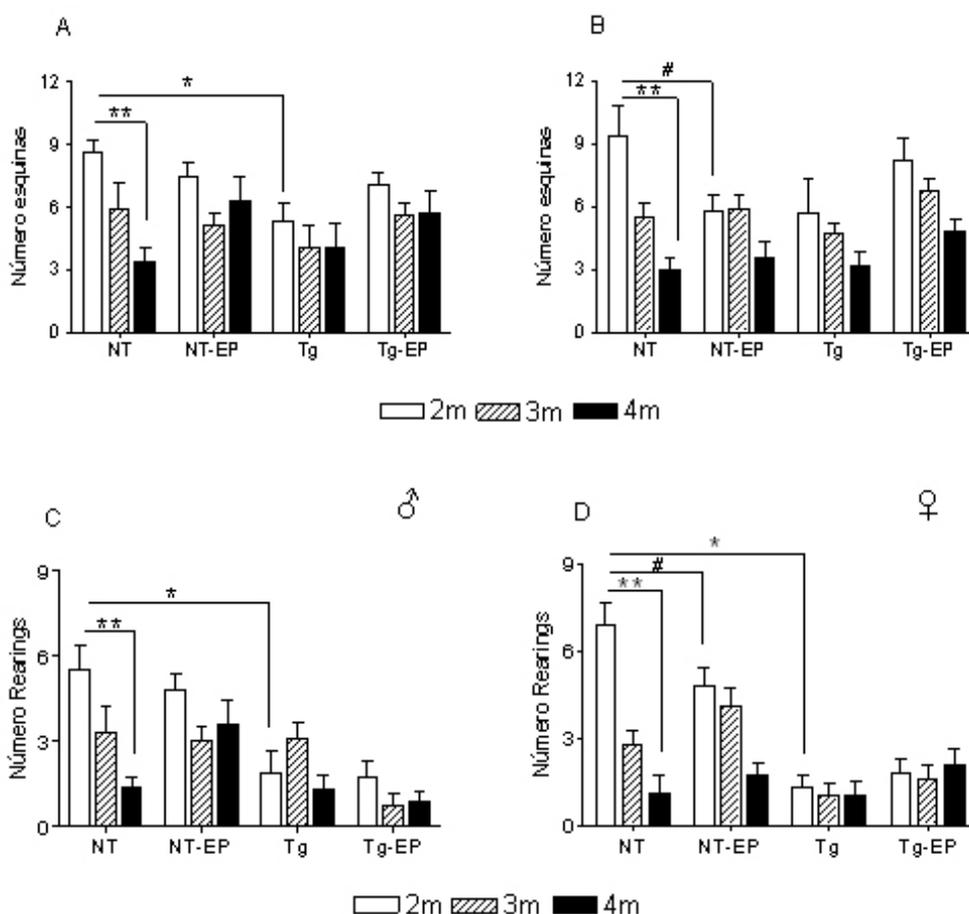


Figura 5.1. Evaluación conductual en el test de neofobia de las esquinas (“Corner test”). **A y B)** Número total de esquinas exploradas durante toda la sesión. **C y D)** Total de exploraciones verticales (*rearings*). Duncan test: * $P < 0.05$, NT vs 3xTgAD del mismo sexo. ** $P < 0.05$, 2m vs 4m del mismo genotipo. # $P < 0.05$, NT vs NT-EP del mismo sexo.

5.2.3. Laberinto acuático de Morris

5.2.3.1. Tarea de aprendizaje espacial de referencia

En la Figura 5.2A-E se representan los resultados de la tarea de aprendizaje (espacial) de referencia (o *“place task”*). Se han utilizado las distancias recorridas por los animales en cada ensayo, en lugar de las latencias (tiempo transcurrido hasta alcanzar la plataforma), puesto que se han encontrado diferencias significativas en velocidad entre los diferentes grupos experimentales (como puede verse en la Fig. 5.2D-E).

Se puede observar como ambos genotipos muestran una clara curva de aprendizaje a través de los días de entrenamiento, como refleja la disminución progresiva de la distancia total recorrida (MANOVA, efecto “día”: $F_{(3,297)}=67.4$, $p<0.001$; Figura 5.2A-B). El MANOVA (2 “genotipo” x 2 “tratamiento” x 2 “sexo” x 4 “día”) muestra, asimismo, efectos significativos del genotipo ($F_{(1,99)}=37.1$, $p<0.001$), del tratamiento ($F_{(1,99)}=6.0$, $p=0.016$) y, marginalmente, del sexo ($F_{(1,99)}=3.9$, $p=0.051$) (ver Fig. 5.2A-C).

En esencia, estos efectos indican que los ratones 3xTgAD son menos eficientes (recorren mayores distancias) que los no transgénicos en la adquisición de la tarea de aprendizaje espacial de referencia, al tiempo que el tratamiento de estimulación postnatal mejora significativamente dicha eficiencia (ver también Fig. 5.2C, que resume el efecto global del “genotipo”, $F_{(1,105)}=36.2$, $p<0.001$, y muestra el efecto del tratamiento de EP).

El efecto “sexo”, aunque marginalmente significativo, sugiere que las hembras son globalmente menos eficientes en esta tarea (Fig. 5.2A-B). El MANOVA (2x2x2x4) aplicado no detecta interacciones significativas entre los factores.

La aplicación de MANOVAs (2 “genotipo” x 2 “tratamiento” x 4 “día”) en ambos sexos por separado indica efectos del “día” en ambos casos (machos: $F_{(2.5,127.3)}=33.7$ $p<0.001$; hembras: $F_{(3,150)}=34.2$ $p<0.001$), del genotipo (machos: $F_{(1,49)}=12.5$ $p=0.001$; hembras: $F_{(1,50)}=25.0$ $p<0.001$) y efecto del tratamiento solamente en las hembras ($F_{(1,50)}=6.1$ $p=0.017$) (ver Fig. 5.2A-B).

Por lo que respecta al análisis de las velocidades (Fig. 5.2 D-E), el MANOVA (2x2x2x4) muestra efectos del “día” ($F_{(2.8,282.5)}=3.5$, $p=0.017$), del genotipo ($F_{(1,99)}=56.9$ $p<0.001$) y del tratamiento ($F_{(1,99)}=15.3$, $p<0.001$). Indican, principalmente, que los animales transgénicos presentan claramente mayor velocidad de natación que los no transgénicos, así como que el tratamiento de estimulación postnatal reduce dicha velocidad de natación hasta el punto de hacerla similar entre ambos genotipos (interacción “genotipo x tratamiento”, $F_{(1,99)}=10.8$, $p=0.001$; ver Fig. 5.2E) particularmente en el caso de las hembras (interacción “sexo x tratamiento”, $F_{(1,99)}=4.8$, $p=0.03$; ver Fig. 5.2C-D).

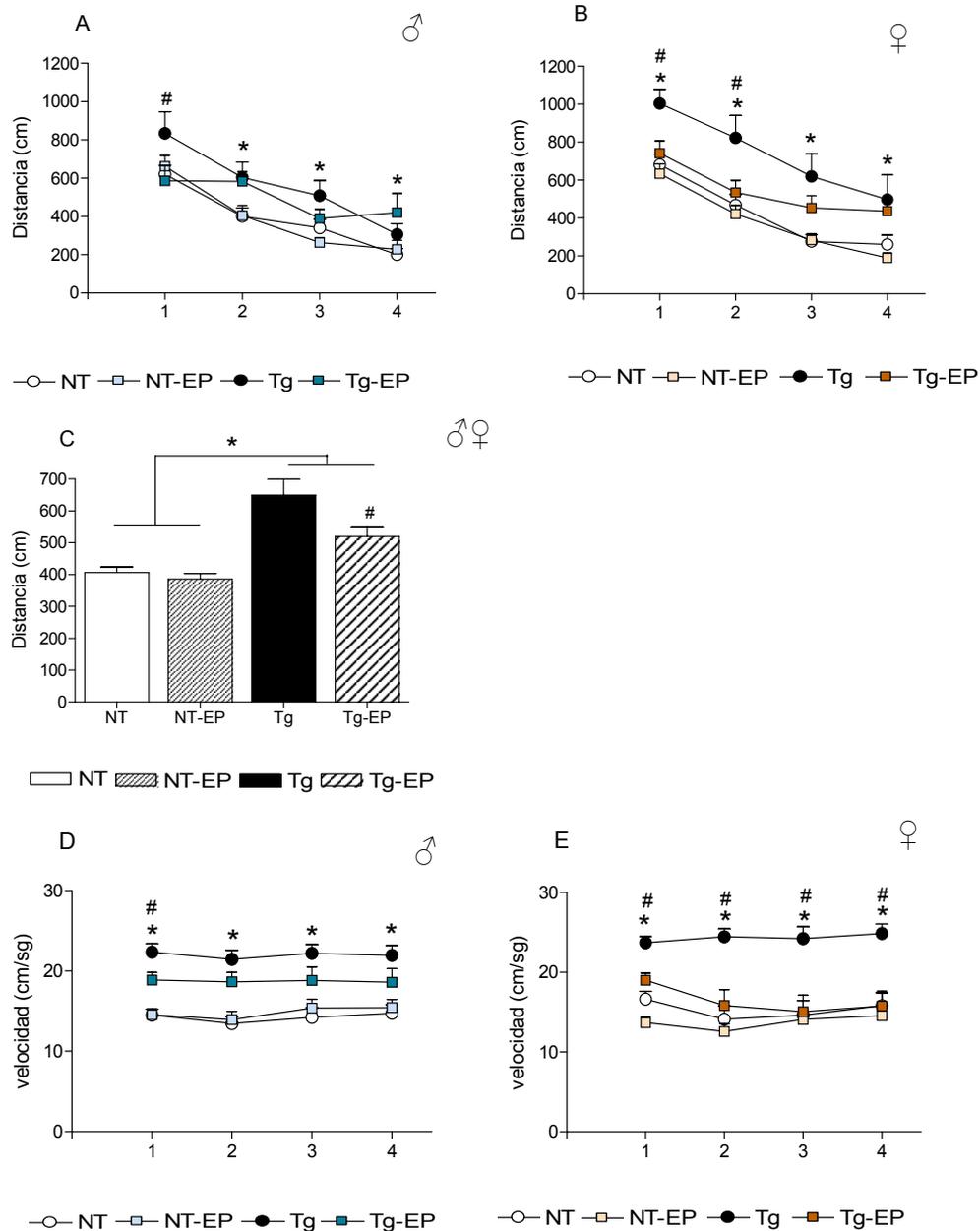


Figura 5.2. Evaluación conductual en el MWM. Resultados expresados como media \pm EE. **A y B)** Distancia recorrida por los animales en cada ensayo. **C)** Distancia promedio de las cuatro sesiones. **D y E)** Velocidad de natación en cada ensayo. Duncan test, $*P < 0.05$, 3xTgAD vs correspondiente NT, $\#P < 0.05$ entre grupo no tratado y tratado del mismo genotipo.

5.2.3.2. Test de memoria (o “*probe test*”) sin plataforma a la 1:30 horas tras la adquisición

Una hora y media después de finalizar el último ensayo de la tarea de adquisición espacial de referencia del cuarto día, se evaluó la capacidad de retención o memoria a corto plazo en un ensayo (60 segundos) sin plataforma. En la Figura 5.3A-D se representan los resultados de dicho test (o “*probe test*”).

Podemos observar los “cruces a través de la posición donde se hallaba la plataforma” (CP; o “*annulus crossings*”), o por las correspondientes posiciones en los otros cuadrantes de la piscina, en la Figura 5.3A y 5.3B. La Figura 5.3C-D representa el porcentaje de preferencia, es decir “(CP x 100)/total de cruces por todas las posibles posiciones de la plataforma”.

El ANOVA global (2 x 2 x 2) de esta variable de preferencia (o memoria), incluyendo ambos sexos, muestra un efecto genético ($F_{(1,99)}= 9.9$, $p=0.002$) y un efecto del tratamiento ($F_{(1,99)}=5.2$, $p=0.025$), indicando un menor número de CP (cruces por la antigua posición de la plataforma) en el caso de los ratones 3xTgAD, así como una reducción de dicha preferencia en el caso de los animales tratados con EP (ver Fig. 5.3C y D).

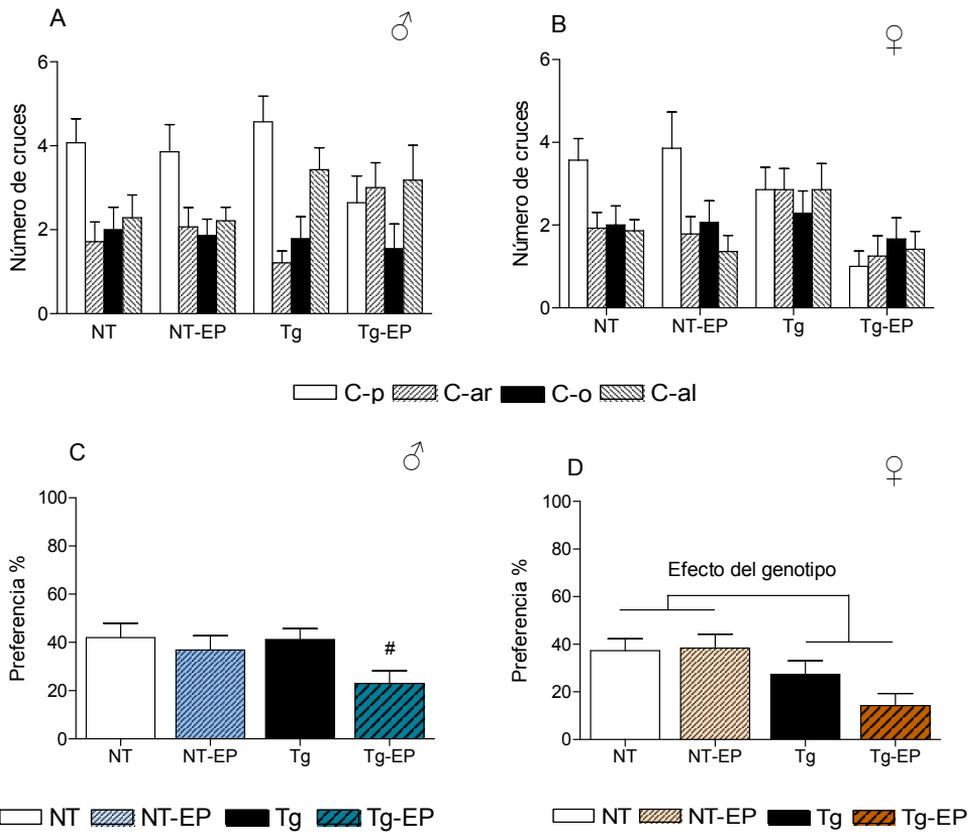


Figura 5.3. Evaluación conductual en el Test de memoria (o “probe test”) sin plataforma a la 1:30 horas tras la adquisición. **A y B)** Número de cruces a través de la posición donde se hallaba la plataforma (C-p) y por las correspondientes posiciones en los otros cuadrantes de la piscina. **C y D)** Porcentaje de preferencia por la posición donde se hallaba la plataforma (C-p). Duncan test # $P < 0.05$ vs respectivo grupo sin tratamiento EP.

En la Figura 5.4A-D se representan las distancias recorridas (DIST) en el cuadrante donde se hallaba la plataforma (DIST-P) y en cada uno de los otros 3 cuadrantes (Fig. 5.4A y B), así como la variable de preferencia según la fórmula “(DIST-P x 100)/total DIST recorrida en todos los cuadrantes” (Fig. 5.4C y D). El ANOVA global (2 x 2 x 2) de esta variable de preferencia (o memoria), incluyendo ambos sexos, muestra un efecto del genotipo ($F_{(1,99)} = 12.59$, $p = 0.001$) y una interacción “genotipo x tratamiento” ($F_{(1,99)} = 12.37$, $p = 0.001$).

Estos efectos indican, respectivamente, una menor distancia DIST-P recorrida (respecto la distancia total) en el caso de los ratones 3xTgAD, así como que el tratamiento de EP reduce dicha variable (esto es, el porcentaje de distancia “DIST-P” respecto a la total) preferentemente en los ratones transgénicos, mientras que produce una cierta mejoría en los animales no transgénicos (Fig. 5.4C y D).

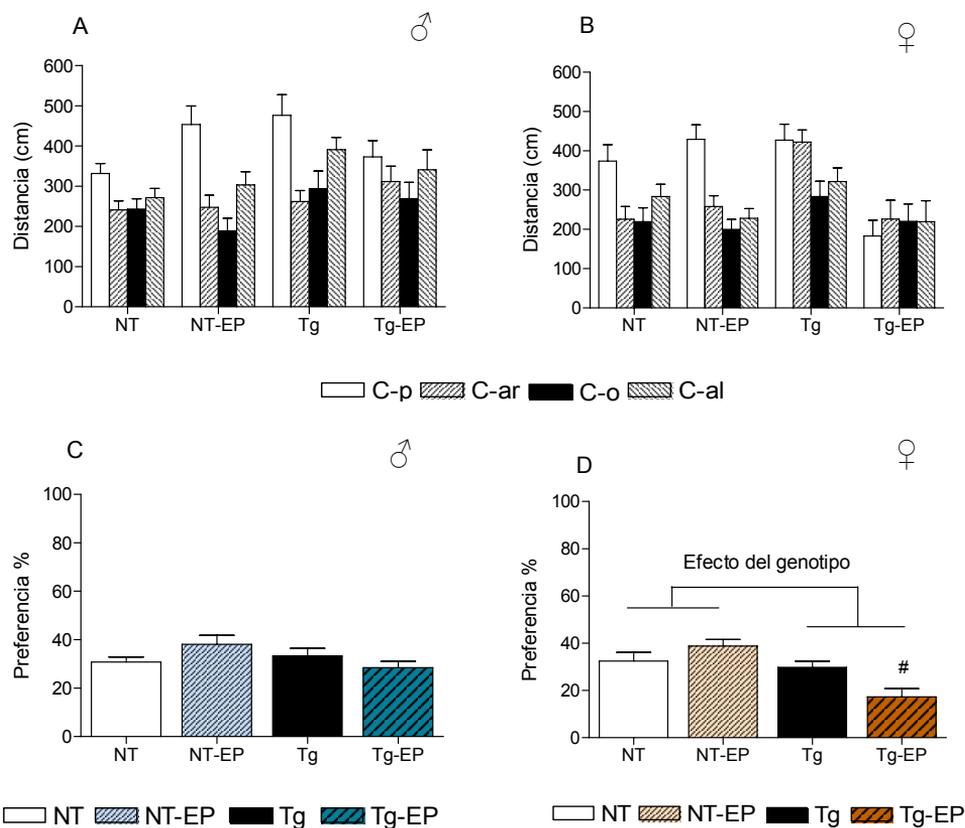


Figura 5.4. Evaluación conductual en el Test de memoria (o “probe test”) sin plataforma a la 1:30 horas tras la adquisición. **A y B)** Distancias recorridas en el cuadrante donde se hallaba la plataforma (DIST-P) y en cada uno de los otros 3 cuadrantes. **C y D)** Porcentaje de preferencia según la fórmula “(DIST-P x 100)/total DIST recorrida en todos los cuadrantes”. Duncan test, [#] $P < 0.05$ vs respectivo grupo sin tratamiento EP.

La Figura 5.5A-B muestra la distancia recorrida desde el inicio del test hasta el primer cruce por la posición donde se hallaba la plataforma. El ANOVA ($2 \times 2 \times 2$), con ambos sexos, resulta en un efecto marginal del “sexo” ($F_{(1,98)}=3.6$, $p=0.059$) y una interacción “sexo x genotipo” ($F_{(1, 98)}=7.8$, $p=0.006$). Para desglosar dicha interacción se aplicó un ANOVA separado para cada sexo, dando lugar únicamente a un efecto del “genotipo” en hembras ($F_{(1,49)}=5.4$, $p=0.025$), que indica una mayor distancia recorrida (hasta el primer paso por la posición de la plataforma) en el caso de los ratones transgénicos hembra (Fig. 5.5B).

Finalmente, la Figura 5.5C-D representa las velocidades de llegada al primer cruce por la posición donde se hallaba la plataforma. El ANOVA ($2 \times 2 \times 2$), incluyendo ambos sexos, muestra efectos del “genotipo” ($F_{(1, 98)}=13.8$, $p<0.001$; indican que los ratones transgénicos son más veloces; ver también pruebas de Duncan en Fig. 5.5C y D), del tratamiento de EP ($F_{(1, 98)}=17.9$, $p<0.001$; indican que el tratamiento reduce globalmente la velocidad) y de la interacción “genotipo x EP” ($F_{(1, 98)}=8.9$, $p=0.004$). Esta interacción se debe a que el tratamiento de EP reduce la velocidad en mayor proporción en los ratones transgénicos que en sus controles y en ambos sexos, como puede observarse en la Figura 5.5C-D y en las pruebas de Duncan que en ella se muestran.

(Nota: las diferencias en velocidad entre ambos genotipos es lo que ha hecho que se escojan principalmente variables de “distancia” para el análisis -menos contaminadas- en lugar de variables de “tiempo” o “latencias”, al igual que ocurría en la fase de adquisición del aprendizaje espacial de referencia).

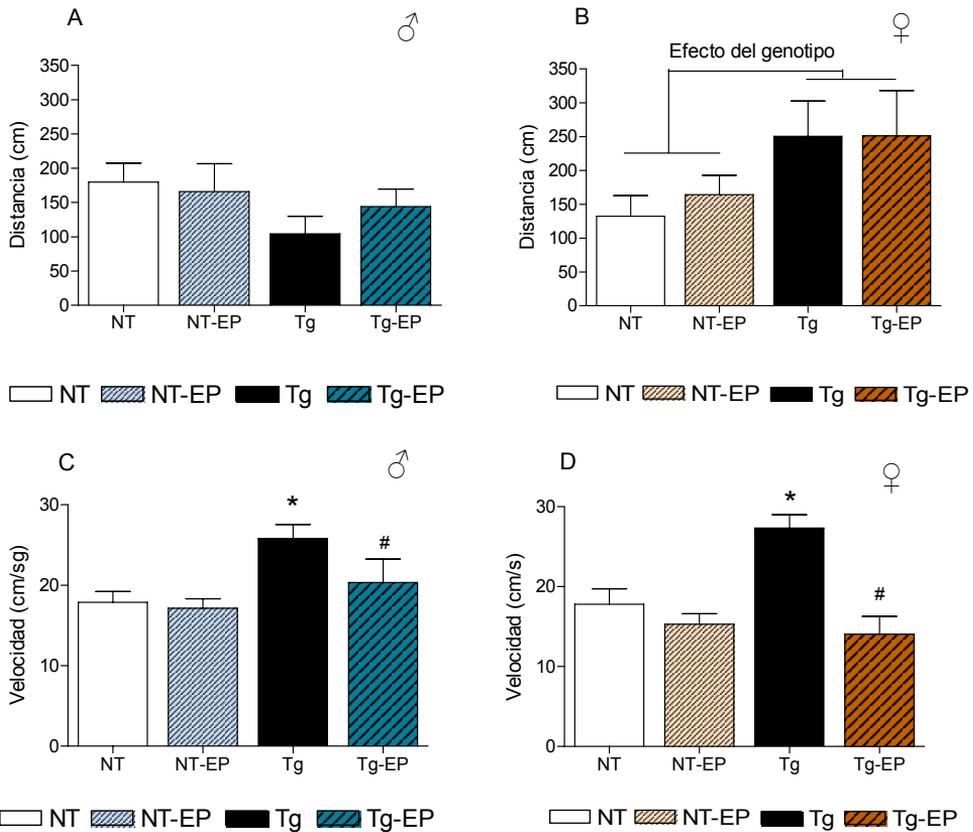


Figura 5.5. Evaluación conductual en el Test de memoria (o “probe test”) sin plataforma a la 1:30 horas tras la adquisición. **A y B)** Distancia recorrida desde el inicio del test hasta el primer cruce por la posición donde se hallaba la plataforma. **C y D)** Las velocidades de llegada al primer cruce por la posición donde se hallaba la plataforma. Duncan test: * $P < 0.05$ entre los correspondientes grupos 3xTgAD y NT ; # $P < 0.05$ vs respectivo grupo sin tratamiento.

5.2.3.3. Test de memoria (o “probe test”) sin plataforma a las 24 horas tras la adquisición

La únicas variables de memoria que resultaron en efectos significativos son las representadas en la Figura 5.6A-D (para la variable CP, como en la sección anterior) y la Figura 5.7A-D (variable DIST-P y porcentaje de preferencia, como en el apartado anterior).

Por lo que respecta a la variable del porcentaje de preferencia por CP, incluyendo ambos sexos, el ANOVA (2 “genotipo” x 2 “sexo” x 2 “EP”) muestra efecto “genotipo” ($F_{(1,99)}=4.7$, $p=0.032$) y una interacción “genotipo x tratamiento” ($F_{(1,99)}=4.0$, $p=0.047$), que indican, respectivamente, una peor ejecución global en esta variable (es decir, menor número relativo de cruces por la posición de la plataforma -o CP- respecto a las otras posibles posiciones de la misma en los otros cuadrantes) en ratones transgénicos, así como que el tratamiento de EP aumenta el valor de dicha variable en los animales no transgénicos mientras que produce el efecto contrario en los transgénicos (Fig. 5.6C y D).

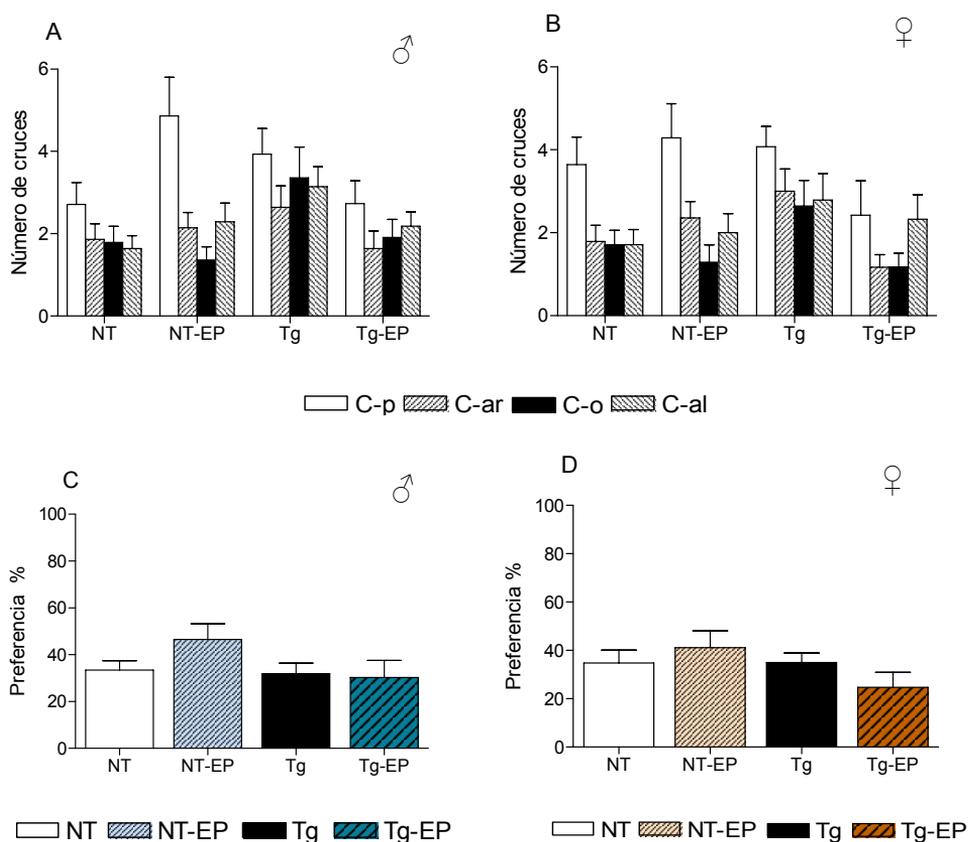


Figura 5.6. Evaluación conductual en el Test de memoria (o “probe test”) sin plataforma a las 24 horas tras la adquisición. **A y B)** Cruces a través de la posición donde se hallaba la plataforma (C-p) y por las correspondientes posiciones en los otros cuadrantes de la piscina. **C y D)** Porcentaje de preferencia.

En cuanto a la variable DIST-P, el ANOVA (2 x 2 x 2) indica un efecto global del genotipo ($F_{(1,99)}=9.1$, $p=0.003$) e interacción “genotipo x tratamiento” ($F_{(1,99)}=6.7$, $p=0.011$), debidos, respectivamente, a que los ratones transgénicos muestran menor preferencia - en términos de DIST-P - relativa por el cuadrante donde se hallaba la plataforma, al tiempo que el tratamiento de EP aumenta dicha preferencia (por el cuadrante de la plataforma) en los animales control y la reduce en los transgénicos (Fig. 5.7C y D).

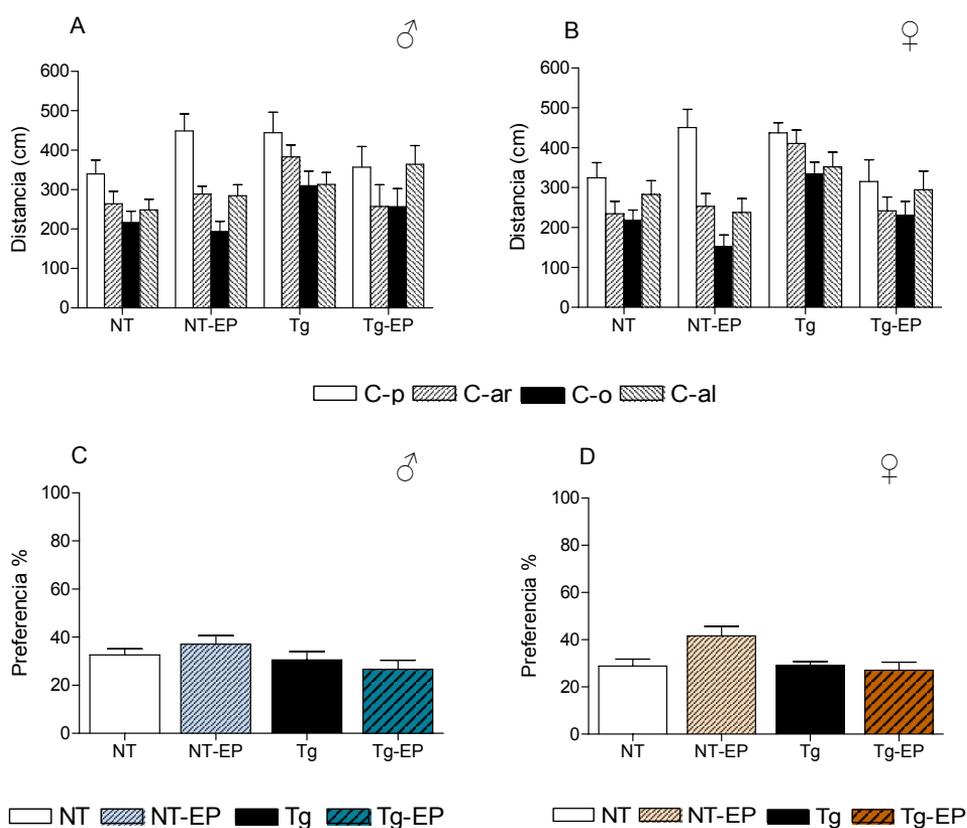


Figura 5.7. Evaluación conductual en el Test de memoria (o “probe test”) sin plataforma a las 24 horas tras la adquisición. **A y B)** distancias recorridas (DIST) en el cuadrante donde se hallaba la plataforma (DIST-P) y en cada uno de los otros 3 cuadrantes **C y D)** el porcentaje preferencia según la fórmula “(DIST-P x 100)/total DIST recorrida en todos los cuadrantes”.

5.2.3.4. Aprendizaje guiado por señales locales (o “cue task”)

En la figura 5.8A-D se muestran los resultados de la tarea de aprendizaje guiado (media y error estándar de los 4 ensayos). Aparecen diferencias en velocidad (Fig. 5.8C-D) debidas al hecho de que es mayor globalmente en los ratones transgénicos (ANOVA 2 x 2 x 2, efecto “genotipo”: $F_{(1,95)}=6.8$ $p=0.01$), mientras que el tratamiento de EP la reduce (efecto “EP, $F_{(1,95)}=9.2$ $p=0.003$) pero en mayor grado en los animales 3xTgAD (efecto interacción “genotipo x EP”, $F_{(1,95)}=6.1$ $p=0.01$) (Fig. 5.8C-D). En cuanto a la eficiencia en la tarea, medida por la distancia recorrida hasta alcanzar la plataforma señalizada con la bandera, el ANOVA no muestra diferencias o efectos significativos de ninguno de los factores ni de interacción (Figura 8A-B).

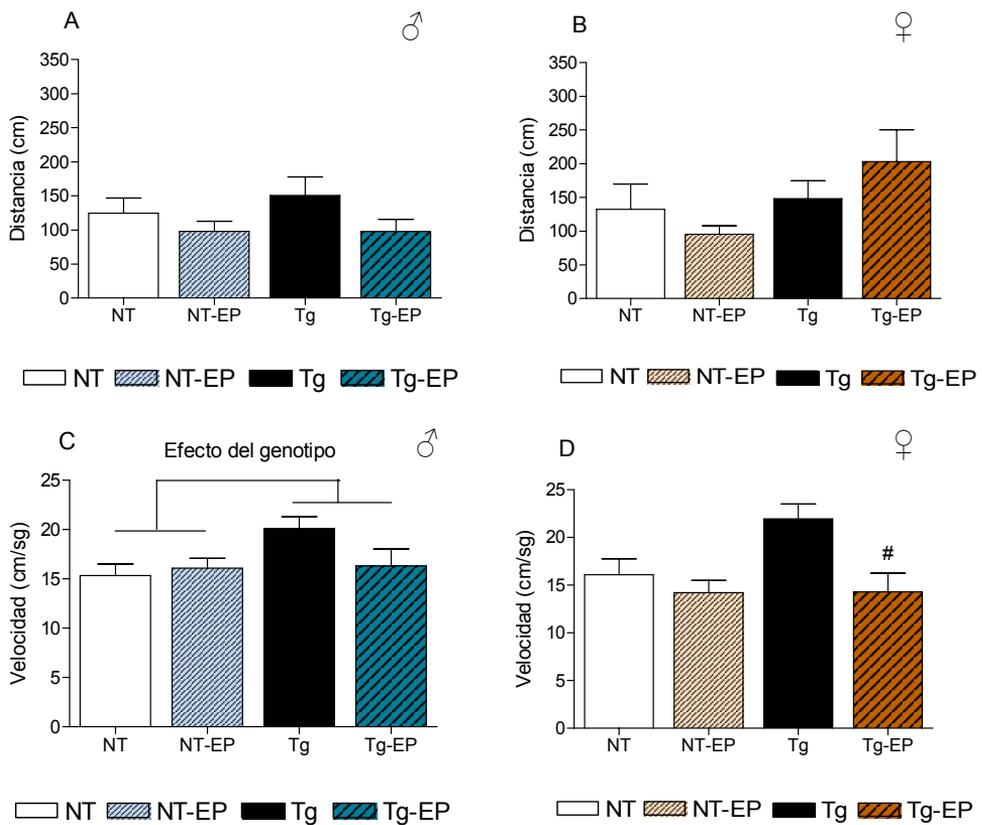


Figura 5.8. Tarea de aprendizaje guiado por señales locales (CUE). **A** y **B**) Distancia recorrida hasta alcanzar la plataforma. **C** y **D**) velocidad de natación hasta alcanzar la plataforma. Duncan test, # $P<0.05$ vs respectivo grupo sin tratamiento EP.

5.2.4. Prueba del Campo Abierto

En la Figura 5.9A-F y 5.10A-D se representan, respectivamente, las diferencias en actividad exploratoria horizontal (CA-deam, deambulaci3n) y en conducta vertical (CA-rear; exploraciones verticales o “rearing”) que realizan los animales durante la prueba del campo abierto. Es importante destacar que el tiempo de la conducta de petrificaci3n (CA-freez; o “freezing”, desde el inicio del test; Fig. 5.9A-B) y el “tiempo de salida del centro” del aparato en direcci3n a la periferia del mismo (CA-centro; Fig. 5.9A-B) correlacionan positiva y significativamente, tanto tomando toda la muestra de animales usada ($r=0.61$ $p<0.001$; $n=107$) como si se toman 3nicamente los 2 grupos de ratones no transg3nicos y controles -no tratados- ($r=0.98$ $p<0.001$; $n=28$) incluyendo ambos sexos (ver Tabla 5.2).

Tabla 5.2. Correlaci3n entre el tiempo de conducta de petrificaci3n o *freezing* (CA-freez) y el tiempo de salida del centro (CA-centro), seg3n la muestra utilizada.

Correlaci3n de Pearson entre CA-freez y CA-centro		
	(r)	(p)
Toda la muestra n=107	0.61	<0.001
Controles NT n=28	0.98	<0.001

Abundando en lo mismo, el an3lisis factorial de las dos variables anteriores junto a los totales de actividad (horizontal y vertical) en los 5 minutos del test (Tabla 5.3. y 5.4), muestra un factor claro para “actividad exploratoria total” de ambos tipos y un factor separado de “inhibici3n conductual ante la novedad” en el que saturan (entre 0.85 y 0.98) las dos variables indicadoras de inhibici3n (CA-freez y CA-centro), tanto para toda la muestra de animales ($n=107$; Tabla 5.3) como para la submuestra de animales no transg3nicos de ambos sexos y sin tratamiento ($n=28$; Tabla 5.4).

Estos resultados correlacionales y factoriales, especialmente los hallados en los ratones no transg3nicos y no tratados de ambos sexos ($n=28$), permiten y

justifican el uso indistinto de “CA-freez” y “CA-centro” como variables indicadoras de inhibición conductual en respuesta a la novedad, y son compatibles con la interpretación de que dichas variables reflejan miedo o ansiedad.

Tabla 5.3. Análisis factorial (rotación VARIMAX) de variables del CA de toda la muestra.

Análisis Factorial (rotación VARIMAX) de variables del CA en toda la muestra (n=107)		
Variables	Factores	
	Actividad exploratoria	Inhibición conductual
CA-deam	0.90	-
CA-rear	0.93	-
CA-freez	-	0.94
CA-centro	-	0.85
Varianza explicada	57.2%	27.4%

Actividad exploratoria horizontal (CA-deam, deambulaci3n), actividad exploratoria vertical (CA-rear; “rearing”), tiempo de conducta de petrificaci3n o *freezing* (CA-freez) y tiempo de salida del centro (CA-centro). Valores de saturaci3n ≥ 0.35

Tabla 5.4. Análisis Factorial (rotaci3n VARIMAX) de variables del CA en ratones NT, no tratados y en ambos sexos.

Análisis Factorial (rotaci3n VARIMAX) de variables del CA en ratones NTg, no tratados y ambos sexos (n=28)		
Variables	Factores	
	Inhibici3n conductual	Actividad exploratoria
CA-deam	-	0.91
CA-rear	-	0.93
CA-freez	0.98	-
CA-centro	0.97	-
Varianza explicada	64.7%	29.0%

Actividad exploratoria horizontal (CA-deam, deambulaci3n), actividad exploratoria vertical (CA-rear; “rearing”), tiempo de conducta de petrificaci3n o *freezing* (CA-freez) y tiempo de salida del centro (CA-centro). Valores de saturaci3n ≥ 0.35

La aplicación del ANOVA global en ambos sexos nos muestra un efecto del genotipo ($F_{(1,99)}=6.2$, $p=0.014$) en la variable CA-centro (Fig. 5.9 A-B), lo que indica que los animales transgénicos tardan más tiempo en salir de la parte central del test, aparentemente por experimentar mayor ansiedad/miedo (inhibición conductual) que los no transgénicos.

Si observamos la actividad motora horizontal minuto a minuto, el MANOVA muestra un efecto global del factor “minuto x genotipo” ($F_{(3.3,326.7)}=4.8$, $p=0.002$), un efecto del genotipo ($F_{(1,99)}=7.0$, $p=0.009$), un efecto del tratamiento ($F_{(1,99)}=5.7$, $p=0.018$) y un efecto “genotipo x tratamiento” ($F_{(1,99)}=4.9$, $p=0.029$) (ver Fig. 5.9 C-D).

En resumen, tales efectos aparecen porque, 1) los ratones no transgénicos presentan mayor actividad horizontal ya desde los primeros minutos de la prueba (Fig. 5.9 C-D) y “habitúan” globalmente más que los transgénicos con el paso de los minutos de test (interacción “minuto x genotipo”; Fig. 5.9 C-D), 2) el genotipo no transgénico presenta mayor actividad horizontal globalmente que los ratones transgénicos (efecto “genotipo”; ver Fig. 5.9 E-F), 3) el tratamiento de EP produce un incremento global de la actividad horizontal (efecto “tratamiento”; Fig. 5.9 C-F), pero dicho aumento es más marcado en los animales no transgénicos (efecto “tratamiento x genotipo”) como se observa con claridad en la Figura 5.9 E-F (ver test de Duncan).

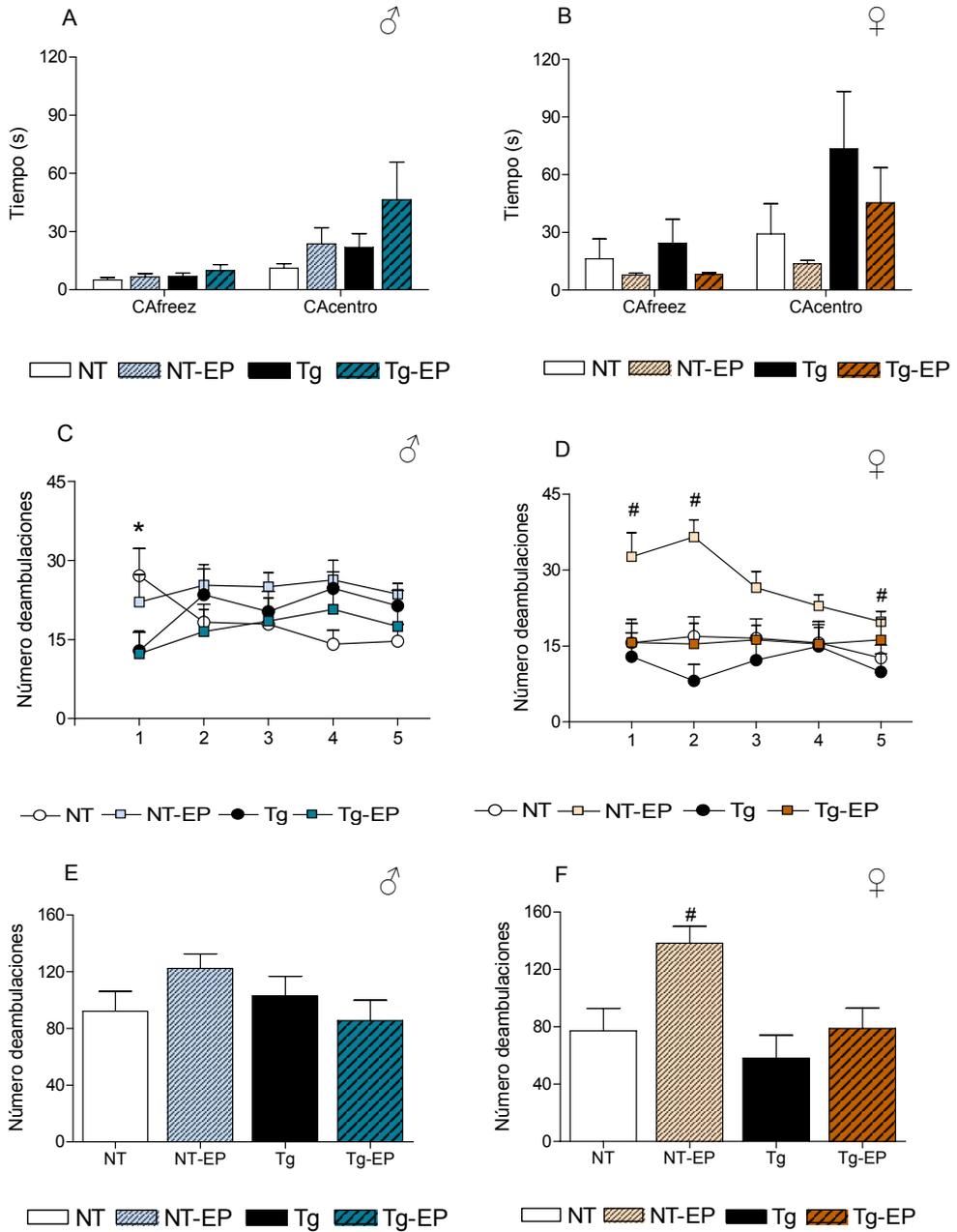


Figura 5.9. Evaluación conductual en el CA. **A y B)** Tiempo (s) de conducta de petrificación o *freezing* (CA-freez) y tiempo (s) de salida del centro (CA-centro). **C y D)** Actividad locomotora horizontal minuto por minuto. **E y F)** Actividad locomotora horizontal acumulada (CA-deam, deambulaciones). * $P < 0.05$, representa el efecto genotipo global. Duncan test: # $P < 0.05$ vs grupo control respectivo.

Si observamos la actividad exploratoria vertical, el MANOVA global, incluyendo ambos sexos, nos muestra un efecto del factor “minuto” ($F_{(3.9,392.0)}=4.1$, $p=0.003$), “minuto x sexo” ($F_{(3.9,392.0)}=6.1$, $p\leq 0.001$), “minuto x sexo x genotipo” ($F_{(3.9,392.0)}=3.5$, $p=0.008$), un efecto “genotipo” ($F_{(1,99)}=31.9$, $p\leq 0.001$), efecto “tratamiento” ($F_{(1,99)}=4.8$, $p=0.03$) y una interacción “genotipo x tratamiento” ($F_{(1,99)}=5.9$, $p=0.017$) (ver Fig. 5.10 A-D).

Resumiendo, respecto a los más relevantes de dichos efectos y en buena concordancia con lo observado en la actividad motora horizontal, los animales transgénicos presentan un menor número de levantamientos exploratorios verticales (efecto “genotipo”), siendo más acusado en el caso de las hembras (interacción “minuto x sexo x genotipo”; ver test de Duncan, $p<0.05$, en Fig. 5.10 A-B).

El tratamiento de EP, al igual que en el caso de la actividad horizontal, aumenta el número total de levantamientos -o *rearings*- (efecto “tratamiento”) de manera significativa, siendo este efecto más marcado en los animales no transgénicos y en ambos sexos (interacción “genotipo x tratamiento”; ver Duncan test, Fig. 5.10 C-D).

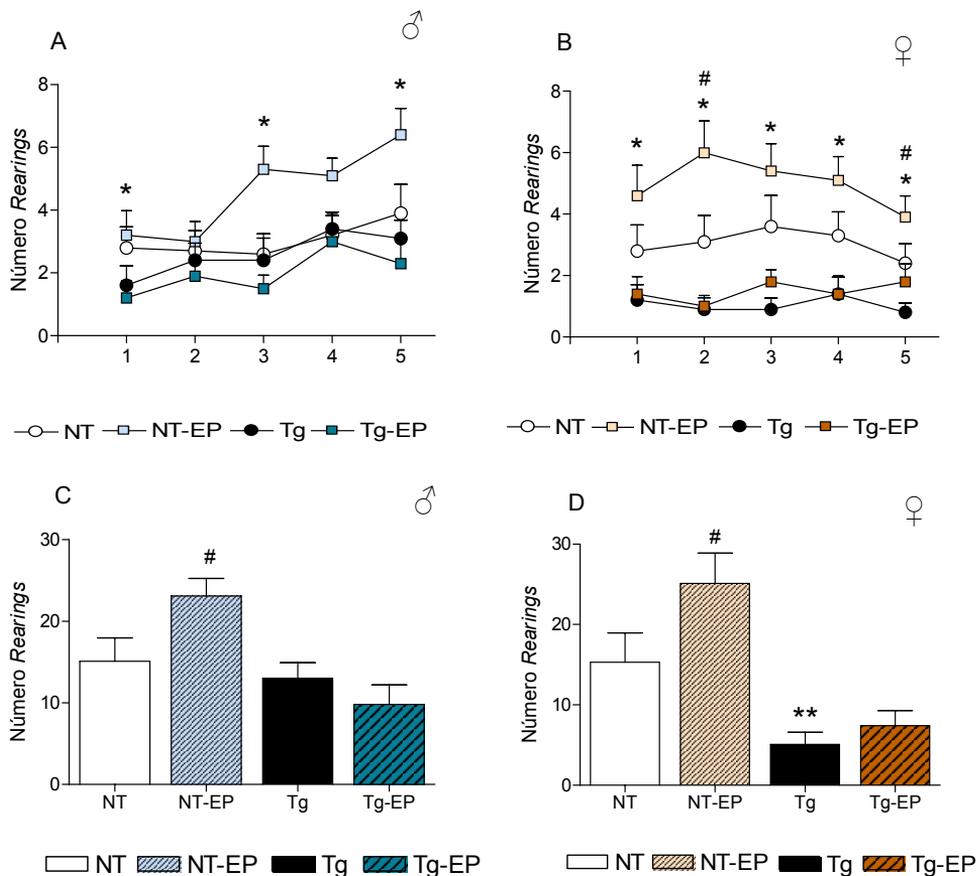


Figura 5.10. Evaluación conductual en el CA. **A y B)** Actividad exploratoria vertical minuto por minuto. **C y D)** Actividad exploratoria vertical acumulada (CA-rear; "rearing"). * $P < 0.05$, efecto del genotipo global. Duncan test; ** $P < 0.05$ 3xTgAD vs NT respectivo; # $P < 0.05$ vs grupo control sin tratamiento respectivo.

5.2.5. Prueba del Laberinto en Cruz Elevado

En la Figura 5.11A-L se representan los resultados de la prueba de ansiedad del "laberinto en cruz elevado". El ANOVA global del "tiempo de latencia de entrada al brazo abierto" (tiempo que tarda el animal en salir por primera vez al brazo desprotegido), nos muestra un efecto del tratamiento EP en ambos sexos y genotipos ($F_{(1,97)}=20.4$, $p < 0.001$). Esto se traduce en una reducción del tiempo de salida en todos los grupos con tratamiento (ver Fig. 5.11A-B), lo que sugiere que la EP disminuye la conducta ansiosa tanto en machos como en hembras.

El ANOVA aplicado a las “entradas en brazos abiertos” (EBA) muestra efectos del genotipo ($F_{(1,97)}=4.4$, $p=0.038$), del tratamiento ($F_{(1,97)}=11.3$, $p=0.001$), del sexo ($F_{(1,97)}=6.6$, $p=0.012$), así como una interacción significativa “genotipo x sexo” ($F_{(1,97)}=7.1$, $p=0.009$). Desglosando esta última, se confirma en machos el efecto del genotipo ($F_{(1,48)}=9.8$, $p=0.003$) y en hembras el efecto del tratamiento ($F_{(1,49)}=10.4$, $p=0.002$) (Fig. 5.11C-D).

En cuanto al número de entradas en los brazos cerrados (EBC; como indicador típico de actividad) el ANOVA muestra efectos del tratamiento de EP ($F_{(1,97)}=10.6$, $p=0.002$), que globalmente tiende a incrementar los valores de esta variable, y un efecto “genotipo x sexo” ($F_{(1,97)}=5.0$, $p=0.027$) indicativo de que las hembras transgénicas (pero no así los machos) presentan valores inferiores de entradas en brazos cerrados (véanse, en hembras, efecto “genotipo”, $F_{(1,49)}=4.2$, $p=0.044$, y efecto “tratamiento”, $F_{(1,49)}=8.8$, $p=0.005$, incluyendo pruebas de Duncan en Fig. 5.11E-F).

Como se observa en la Figura 5.11G-H, los ratones transgénicos pasaron, globalmente, más tiempo en los brazos abiertos (TBA; efecto “genotipo”, $F_{(1,97)}=4.2$, $p=0.043$), siendo además significativo el efecto del “sexo” ($F_{(1,97)}=4.9$, $p=0.028$), puesto que los machos de ambos genotipos presentan valores más elevados que las hembras en dicha variable ($F_{(1,48)}=5.1$, $p=0.028$; Fig. 5.11G).

Aunque el efecto del “genotipo” en algún caso se aproximó a la significación (ver a continuación), no encontramos diferencias o efectos principales (ni de interacción) netamente significativos en las medidas de “porcentaje de entradas en los brazos abiertos” (%EBA; “genotipo”, $F_{(1,97)}=2.1$, $p=0.14$; Fig. 5.11I-J) o “porcentaje de tiempo pasado en los brazos abiertos” (%TBA; “genotipo”, $F_{(1,97)}=3.6$, $p=0.059$; Fig. 11K-L). Tan solo encontramos un efecto del sexo en el “porcentaje de tiempo pasado en los brazos abiertos” ($F_{(1,97)}=4.2$, $p=0.042$; Fig. 5.11K-L), indicativo de que los animales macho pasan un mayor tiempo en los brazos abiertos respecto de las hembras.

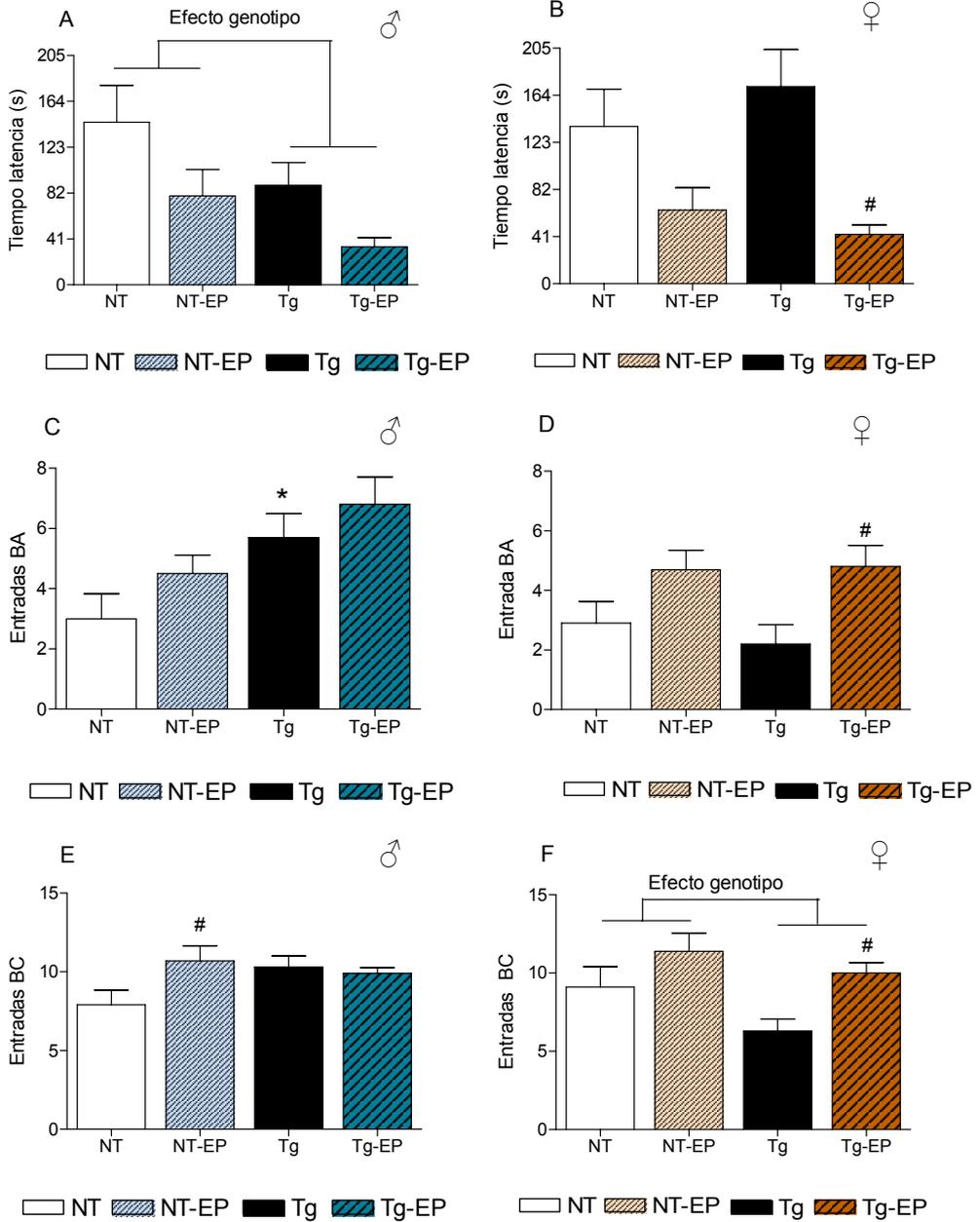


Figura 5.11. Evaluación conductual en el PM. **A y B)** Tiempo de latencia de entrada en los brazos abiertos del PM. **C y D)** Número de entradas en los brazos abiertos (EBA). **E y F)** Número de entradas en los brazos cerrados (EBC). Duncan test: $*P < 0.05$ entre 3xTgAD y NT no tratados; $\#P < 0.05$ vs respectivo grupo control (sin tratamiento).

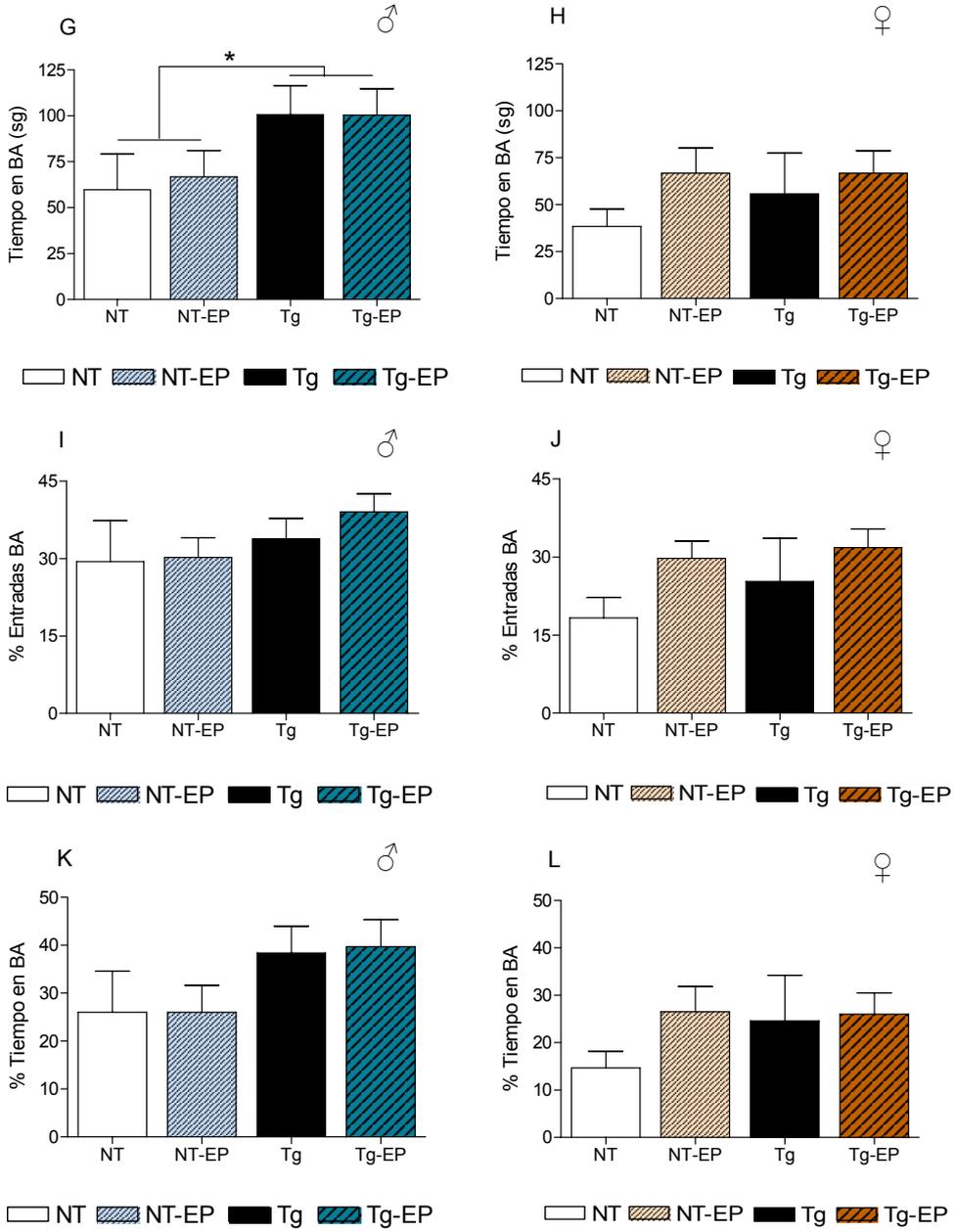


Figura 5.11 (continuación). Evaluación conductual en el PM. **G y H)** Tiempo pasado en los brazos abiertos (TBA). **I y J)** Porcentaje de entradas en los brazos abiertos del PM (%EBA). **K y L)** Porcentaje de tiempo pasado en los brazos abiertos (%TBA). * $p < 0.05$, representa el efecto "genotipo" global .

5.2.6. Tabla de 16 agujeros de Boissier

En la figura 5.12A-F se representan el “número total de agujeros explorados” (nHB), el “tiempo total de exploración” (tHB) y el porcentaje de agujeros centrales explorados en la tabla de 16 agujeros de Boissier (HB). El ANOVA global nos muestra un efecto “sexo” ($F_{(1,99)}=9.7$, $p=0.02$) y una interacción “sexo x genotipo” ($F_{(1,99)}=16.27$, $p<0.001$), dado que son los machos globalmente (efecto “sexo”) los más exploradores, pero al mismo tiempo son los machos transgénicos los que presentan una mayor actividad de exploración de los agujeros (interacción “genotipo x sexo”). Así, dependiendo del género que observemos, encontramos una respuesta opuesta de los animales transgénicos (Fig. 5.12A-B). Esto viene reflejado por los ANOVA para cada sexo, que muestran un efecto “genotipo” en machos ($F_{(1,49)}=9.7$, $p=0.003$, ver también prueba Duncan; Fig. 5.12A) indicativo de mayor conducta exploratoria en los transgénicos, y un efecto “genotipo” en hembras ($F_{(1,50)}=6.6$, $p=0.013$) que indica justo la tendencia contraria (menor actividad exploratoria en hembras transgénicas que en las controles).

En el caso del tiempo que pasan los animales explorando los agujeros (tHB; Fig. 5.12C-D), el ANOVA nos muestra una interacción significativa “sexo x genotipo” ($F_{(1,99)}=14.0$, $p\leq 0.001$) al igual que en el caso de la variable nHB. Así, los machos 3xTgAD también emplean un mayor tiempo de exploración de los agujeros que los NTg (efecto “genotipo” $F_{(1,49)}=14.7$, $p\leq 0.001$, ver test de Duncan; Fig. 5.12C). Los machos transgénicos, no tan solo muestran una mayor exploración y tiempo de exploración de los agujeros, sino que también muestran un mayor porcentaje de exploración de los agujeros que se encuentran en el centro del aparato (Fig. 5.12E-F). En este caso, el ANOVA global muestra, de nuevo: (1) un efecto “sexo” ($F_{(1,99)}=28.3$, $p\leq 0.001$), pues las hembras exploran menos el centro; (2) un efecto marginal del “genotipo” ($F_{(1,99)}=3.7$, $p=0.054$), que tiende a reflejar que los ratones transgénicos pasan mayor tiempo en los agujeros centrales, y (3) una interacción “sexo x genotipo” ($F_{(1,99)}=3.9$, $p=0.049$). El ANOVA parcial (sexos separados), nos muestra un

efecto “genotipo” ($F_{(1,49)}=6.8$, $p=0.012$) en el caso de los machos, siendo los animales transgénicos los que presentan un mayor porcentaje de actividad de exploración en el centro del aparato (Fig. 5.12E).

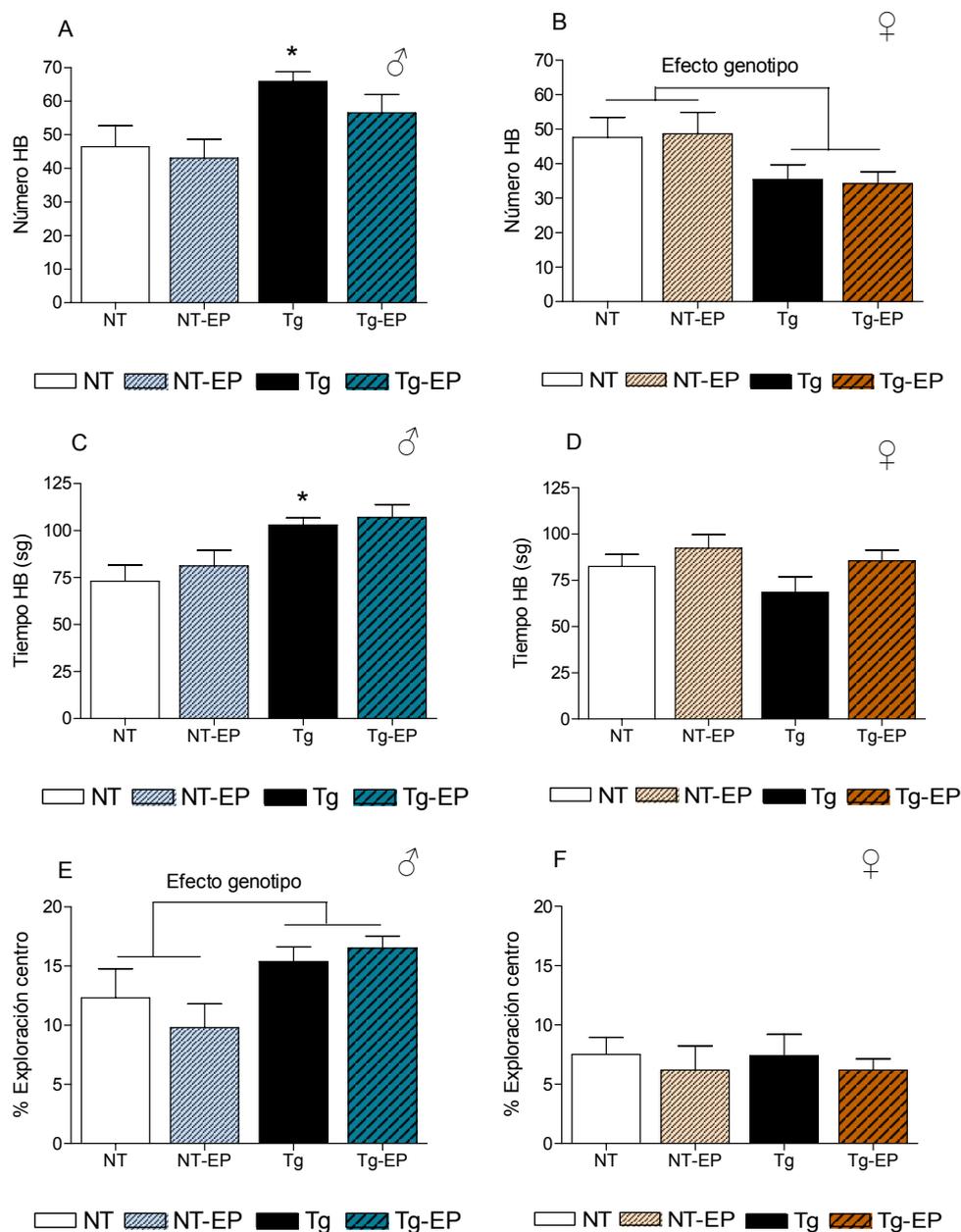


Figura 5.12. Evaluación conductual en el test HB. **A y B)** Número total de agujeros explorados. **C y D)** Tiempo dedicado a las exploraciones durante toda la sesión. **E y F)** Porcentaje de agujeros explorados en el centro. Duncan test: * $P < 0.05$, 3xTgAD vs NT del mismo sexo.

5.2.7. Prueba de la Caja blanca/negra

En la Figura 5.13A-H se representan los resultados de la latencia de entrada (LAT), el número total de entradas (NE), el tiempo pasado (T) y la actividad horizontal (número de cruces) realizada en el compartimento claro de la caja blanca/negra (“DLB” o *Dark light box*). No se encuentran diferencias entre ambos genotipos en cuanto a la “latencia de entrada” o tiempo transcurrido hasta la primera entrada al compartimento blanco (efecto “genotipo”, $F_{(1,98)}=2.1$, $p=0.14$; Fig. 5.13A-B), mientras que el ANOVA muestra una interacción “genotipo x tratamiento” ($F_{(1,98)}=4.9$, $p=0.029$) indicativa de que el tratamiento de EP tiende a disminuir la latencia en los animales transgénicos al tiempo que la incrementa en las hembras NTg (ver test de Duncan, Fig. 5.13A-B).

El ANOVA aplicado al número total de entradas en el compartimento blanco (Fig. 5.13C-D) muestra un efecto “genotipo” ($F_{(1,98)}=5.6$, $p=0.019$) y un efecto “sexo” ($F_{(1,98)}=15.7$, $p\leq 0.001$), siendo los machos transgénicos los que muestran un mayor número de entradas (efecto “genotipo” en machos, $F_{(1,49)}=6.8$, $p=0.012$).

El ANOVA de tiempo pasado en el compartimento blanco (Fig. 5.13E-F) también muestra un efecto “genotipo” ($F_{(1,98)}=5.1$, $p=0.025$) y un efecto del sexo ($F_{(1,98)}=13.7$, $p\leq 0.001$), siendo los machos transgénicos los que vuelven a presentar de nuevo un mayor tiempo pasado en la zona clara respecto a los no transgénicos (efecto “genotipo” en machos, $F_{(1,49)}=8.6$, $p=0.005$; ver test de Duncan, Fig. 5.13E). En el caso de las hembras encontramos una interacción “genotipo x tratamiento” ($F_{(1,50)}=4.3$, $p=0.043$), que indica que dependiendo del genotipo el efecto del tratamiento es en sentido contrario (ver Fig. 5.13F).

Si observamos la actividad (nº de cruces) que realizan los animales una vez han entrado en el compartimento claro de la caja blanca/negra (Figura 5.13G-H) vemos que las figuras son completamente coherentes con las de la variable anterior (T; Fig. 5.13E-F). Así, el ANOVA global muestra un efecto “genotipo”

($F_{(1,98)}=4.8$, $p=0.029$) y un efecto “sexo” ($F_{(1,98)}=18.9$, $p\leq 0.001$), confirmando una menor actividad en las hembras (efecto “sexo”) y mayor actividad por parte de los animales macho transgénicos respecto a sus respectivos controles no transgénicos (efecto “genotipo” en machos; $F_{(1,49)}=5.3$, $p=0.025$; ver test de Duncan; Fig. 5.13G).

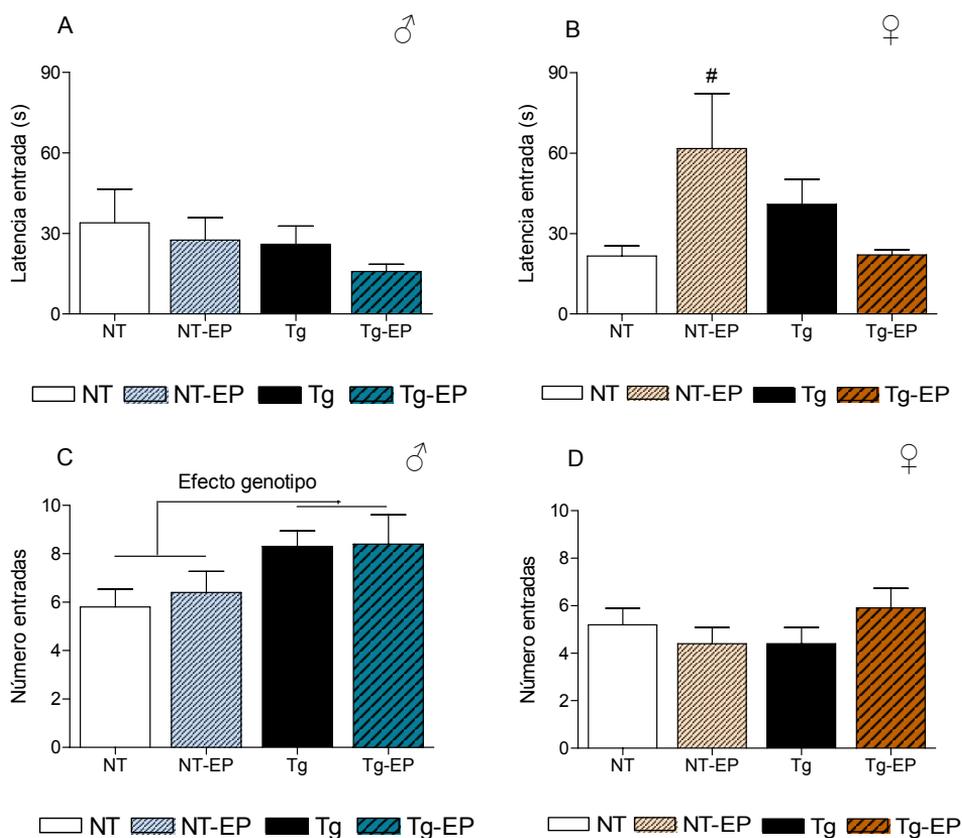


Figura 5.13. Evaluación conductual en la DLB. **A y B)** latencia de entrada al compartimento claro. **C y D)** Número de entradas al compartimento claro. Duncan test: # $P<0.05$ vs respectivo grupo control (no tratado).

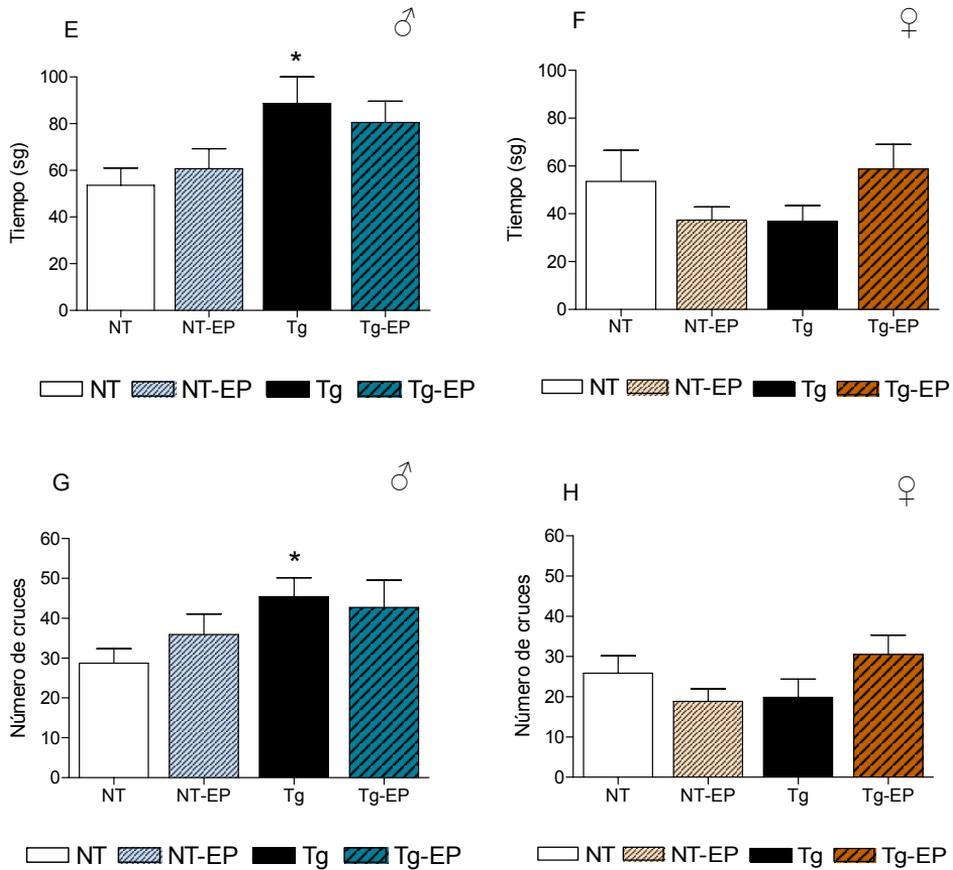


Figura 5.13 (continuación). E y F) Tiempo en el compartimento claro. G y H) Actividad motora en el compartimento claro de la DLB, se muestra la media \pm EE. Duncan test, * $P < 0.05$, 3xTgAD vs NT del mismo sexo.

5.2.8. Actividad espontánea durante 24h

Las figuras 5.14A-B muestran la variación en la actividad motora basal (o espontánea) durante todo el ciclo circadiano. El análisis estadístico mediante ANOVA con medidas repetidas (MANOVA) mostró cambios significativos en el nivel de actividad de los animales a lo largo del ciclo luz-oscuridad, con un efecto del factor “hora” ($F_{(3,1,315,8)}=8.8$, $p < 0.001$), una interacción “hora x tratamiento” ($F_{(3,1,315,8)}=2.7$, $p=0.039$) y otra interacción “genotipo x tratamiento” ($F_{(1,99)}=5.3$, $p=0.023$).

Esta última interacción nos indica que el efecto del tratamiento EP varía dependiendo del genotipo (ver Fig. 5.14C-D, donde se representan los valores totales –acumulados- de actividad).

La Figura 5.14E-F ayuda a entender que la interacción “genotipo x tratamiento” se debe a que el tratamiento de EP disminuye claramente la actividad nocturna en machos transgénicos (con una tendencia similar en hembras) mientras que presenta una tendencia a incrementar la actividad en los animales NTg. A pesar de que no surjan efectos “sexo” globales, realizaremos análisis por sexos separados, en casos convenientes, con objeto de “disecionar” en más detalle los resultados.

Pero, si aplicamos un MANOVA independiente para el ciclo de luz (diurno) y otro para el ciclo de oscuridad (nocturno), podemos observar como esta variación de la actividad es significativa sólo durante el ciclo diurno, mostrando un efecto del factor “hora” ($F_{(4.5, 445.3)} = 21.9, p \leq 0.001$) y una interacción “genotipo x tratamiento” ($F_{(1,99)} = 4.6, p = 0.035$) (Fig. 14A-B). Esta interacción refleja, en esencia, que en ratones no transgénicos de ambos sexos, el tratamiento de EP incrementa la actividad en la fase diurna (obsérvese en detalle la Fig. 5.14A-B y el resumen de totales acumulados en la Fig. 5.14E-F).

El estudio pormenorizado del comportamiento en ambos sexos por separado muestra, en la fase de luz, un efecto “hora” tanto en machos (MANOVA, $F_{(3.3, 164.2)} = 10.5, p \leq 0.001$) como en hembras ($F_{(2.4, 122.79)} = 12.3, p \leq 0.001$), que refleja la habituación de la actividad a través de las horas (Fig. 5.14A-B).

En la fase nocturna, y en machos, el MANOVA muestra una interacción “genotipo x tratamiento” ($F_{(1,49)} = 4.1, p = 0.047$), indicativa de que los machos 3xTgAD desarrollan una mayor actividad durante el ciclo de oscuridad (o hiperactividad locomotora) y el tratamiento EP reduce dicha hiperactividad (ver test de Duncan, Fig. 5.14E).

En las hembras, y en la fase de oscuridad, se observa una interacción “hora x genotipo” (MANOVA, $F_{(7.1,355.3)}=2.22$, $p=0.031$), que refleja diversas variaciones en actividad en función del genotipo y de la hora pero sin un patrón que sea claramente interpretable (Fig. 5.14F).

El análisis de la actividad en respuesta a la novedad, es decir, durante la primera media hora del test (y en la fase de luz), muestra un efecto global del sexo ($F_{(1,99)}=9.4$, $p=0.003$), dado que las hembras son menos activas, y una interacción “genotipo x tratamiento” ($F_{(1,99)}=17.5$, $p\leq 0.001$) (Fig. 14-G-H). Tal interacción indica, tal y como hemos comentado en pruebas anteriores, que el tratamiento EP “normaliza” la actividad del animal transgénico hasta valores similares a los del animal no transgénico no tratado, y, por el contrario, la EP activa o aumenta la actividad motora en los animales no transgénicos (ver test Duncan, Fig. 14G-H).

Durante los primeros 30 minutos de la fase oscura, el ANOVA muestra una tendencia a la interacción “genotipo x tratamiento” ($F_{(1,99)}=3.2$, $p=0.077$) que aproximadamente va en el mismo sentido mencionado en el párrafo anterior (Fig. 14I-J).

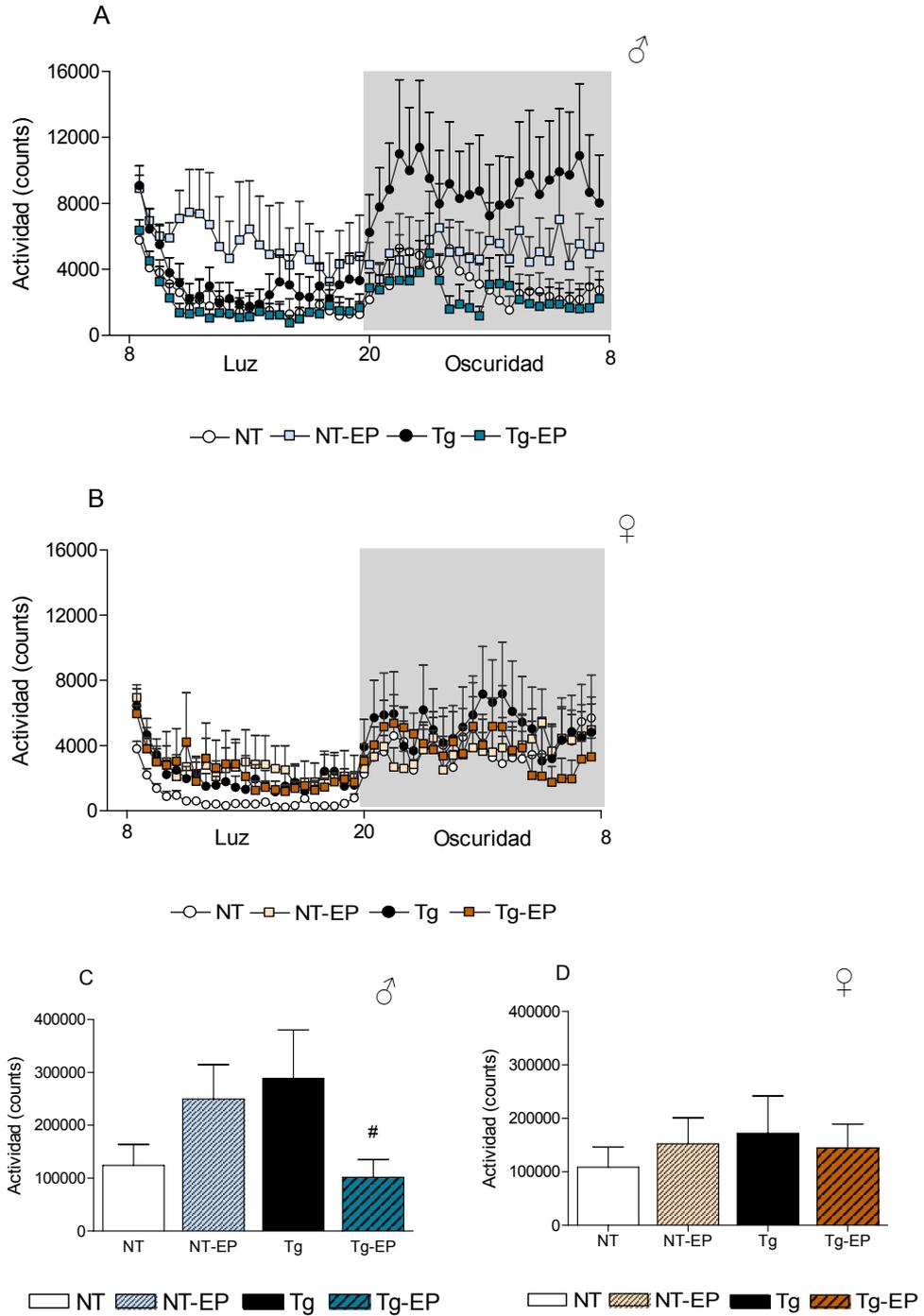


Figura 5.14. Evaluación conductual en la prueba de actividad espontánea basal durante el ciclo circadiano. **A y B)** Actividad locomotora basal durante 24 horas (counts). **C y D)** Actividad total acumulada (counts). Duncan test, # $p < 0.05$, vs grupo 3xTgAD sin tratamiento.

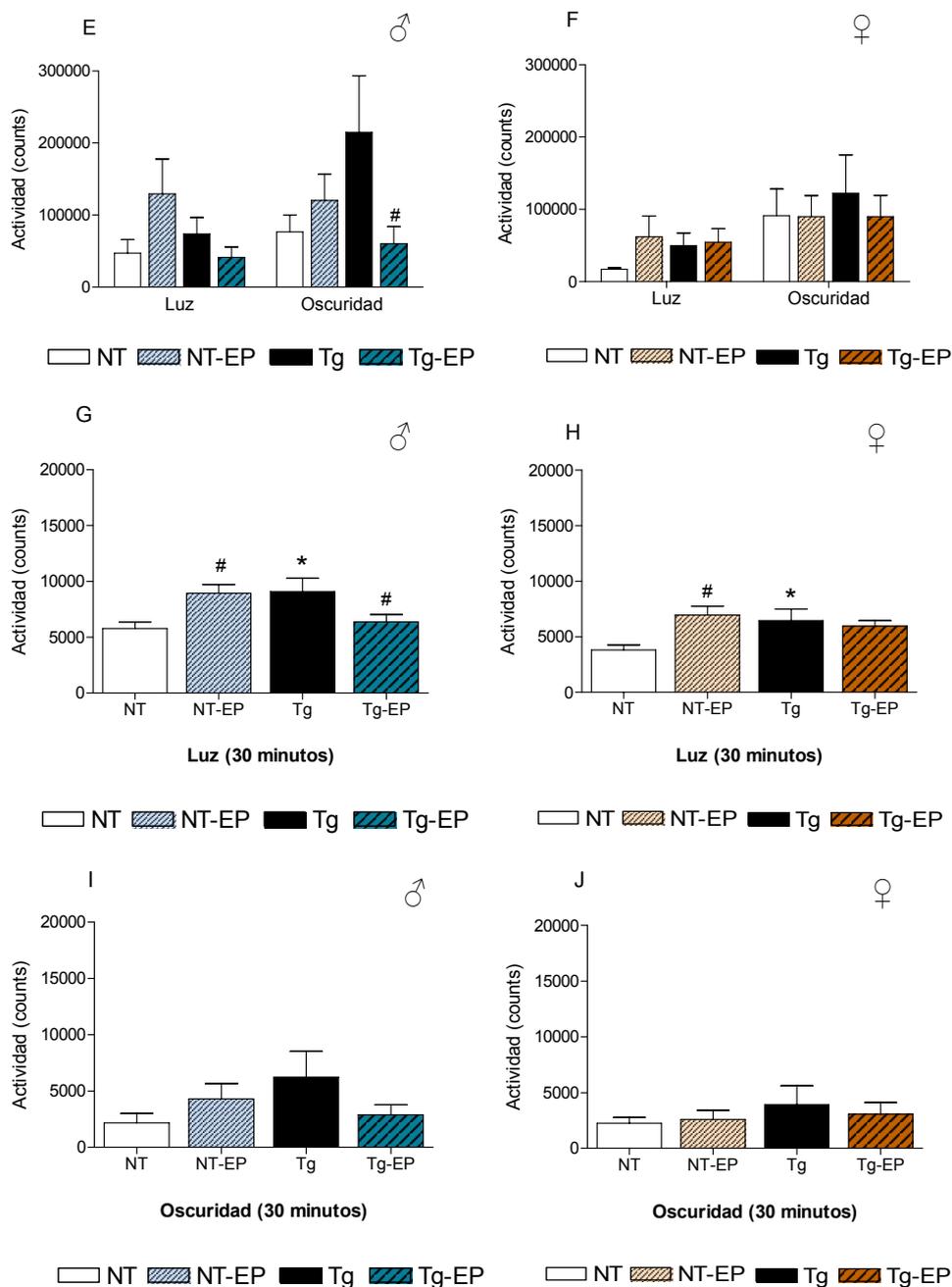


Figura 5.14 (continuación). Evaluación conductual en la prueba de actividad espontánea basal (en “counts”) durante 24h. **E y F)** Actividad diurna y nocturna acumulada. **G y H)** Actividad realizada durante los primeros 30 minutos del test. **I y J)** Actividad realizada durante los primeros 30 minutos tras el inicio de la fase oscura. Duncan test: * $P < 0.05$, 3xTgAD vs NT del mismo sexo; # $P < 0.05$ vs respectivo grupo no tratado.

En la Tabla 5.5 se muestra la evolución del peso de los animales correspondiente al periodo de 24 horas de duración de la prueba de actividad locomotora basal. Era esperable que el efecto del aislamiento y la exposición a la novedad durante 24 horas provocase pérdidas de peso en los ratones. El MANOVA muestra que los animales perdieron peso entre la primera medida (antes del inicio del test de actividad de 24 h) y la segunda, tomada nada más sacar los animales de las cajas de actividad (efecto “hora”, $F_{(1,99)}=238.4$ $p<0.001$), pero que tal pérdida de peso fue relativamente mayor en los ratones 3xTgAD (lo muestra la interacción “hora x genotipo”, $F_{(1,99)}=7.6$ $p=0.007$).

Aparecieron también efectos del sexo ($F_{(1,99)}=97.7$, $p<0.001$; las hembras pesan menos), del genotipo ($F_{(1,99)}=28.9$, $p<0.001$; los ratones transgénicos pesan más), del tratamiento ($F_{(1,99)}=9.9$, $p=0.002$; los ratones tratados con EP pesan más) y de la interacción “sexo x genotipo” ($F_{(1,99)}=9.4$, $p=0.003$), pues el incremento de global de peso que presentan los ratones transgénicos (respecto a los NTg) es más pronunciado en los machos (ver también test de Duncan, en Tabla 5.5).

Tabla 5.5. Peso de los animales antes y después de la prueba de actividad espontánea (24 h).

Pesos	Machos				Hembras			
	No-transgénico		3xTgAD		No-transgénico		3xTgAD	
	Control <i>n</i> =14	EP <i>n</i> =14	Control <i>n</i> =14	EP <i>n</i> =11	Control <i>n</i> =14	EP <i>n</i> =13	Control <i>n</i> =14	EP <i>n</i> =12
Inicio(g)	31.2±0.7	32.3±0.7	36.7±1.5*	41.2±2.1#	26.1±0.9	27.0±0.7	26.7±0.9	30.3±1.3#
Final (g)	30.6±0.8	31.5±0.8	35.1±1.5*	39.9±2.1#	24.7±0.9	25.7±0.6	25.3±0.9	28.7±1.2#

Duncan test: * $P<0.05$, 3xTgAD vs respectivo grupo NT del mismo sexo; # $P<0.05$, vs respectivo control sin tratamiento (mismo genotipo).

5.2.9. Laberinto hexagonal en túnel

En la Figura 5.15A-D, se representa la conducta en la prueba del laberinto hexagonal en túnel. Se muestra la actividad motora (Fig. 15A-B) durante los 6 minutos que duró el test, así como el tiempo que tarda el animal en explorar los seis brazos diferentes (“Latencia”; Fig. 5.15C-D).

El ANOVA global de la distancia recorrida, muestra un efecto del sexo ($F_{(1,55)}=7.1$, $p=0.01$), efecto del genotipo ($F_{(1,55)}=11.6$, $p=0.001$) e interacción “genotipo x tratamiento” ($F_{(1,55)}=6.3$, $p=0.015$). El efecto “sexo” nos indica que los machos muestran una mayor actividad global respecto a las hembras. El efecto “genotipo” indica que los animales transgénicos son los que presentan una mayor distancia recorrida respecto al grupo de ratones no transgénicos (ver test de Duncan en Fig. 5.15A-B).

La interacción “genotipo x tratamiento” es debida a que el tratamiento de EP produce una disminución global de la actividad en animales transgénicos, llegando a valores similares a los de la actividad mostrada por los ratones no transgénicos, y, en cambio, la EP tiende a producir un efecto de tendencia contraria (esto es, al incremento de la actividad) en los animales no transgénicos, como se observa en la Figura 5.15A-B (ver test de Duncan).

Si observamos el tiempo de latencia, o tiempo que tarda el animal en explorar los 6 brazos diferentes, el ANOVA global con ambos sexos nos muestra un efecto del genotipo ($F_{(1,55)}=7.2$, $p=0.009$) y una interacción “genotipo x tratamiento” ($F_{(1,55)}=6.1$, $p=0.017$). Estos efectos obedecen a que los animales 3xTgAD tardan globalmente menos tiempo en explorar por completo los 6 brazos (efecto “genotipo”; ver también prueba Duncan en Fig.5.15C-D), mientras que los efectos del tratamiento de EP son de sentido contrario entre ambos genotipos (interacción “genotipo x tratamiento”), pues la EP aumenta la latencia en los transgénicos al tiempo que la disminuye en los ratones NTg (Fig. 5.15C-D).

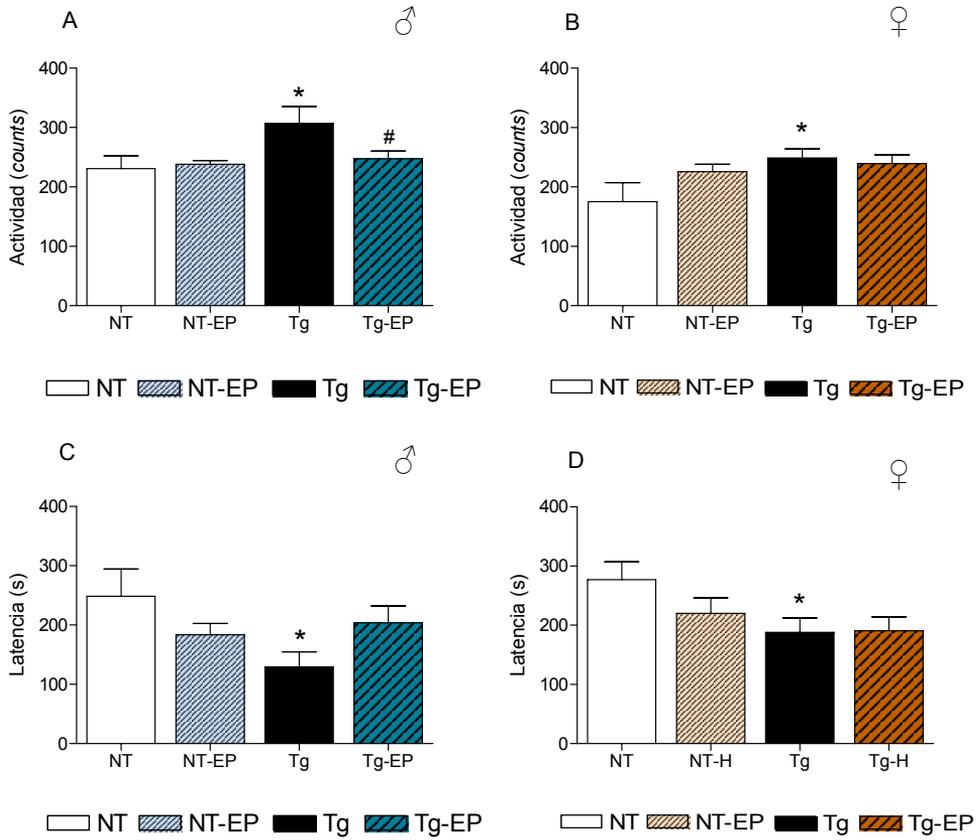


Figura 5.15. Evaluación conductual en la prueba del laberinto hexagonal de 6 brazos en túnel. **A** y **B**) Distancia recorrida durante la sesión (*counts*). **C** y **D**) Tiempo de latencia (s) que tarda el animal en explorar los 6 brazos diferentes. Duncan test: * $P < 0.05$, 3xTgAD vs NT (no tratado) del mismo sexo; # $P < 0.05$, vs grupo 3xTgAD no tratado (Tg).

5.3. DISCUSIÓN DEL ESTUDIO II

5.3.1. Aprendizaje y memoria espacial en ratones

3xTgAD: efectos de la estimulación postnatal

Para evaluar el aprendizaje espacial y la memoria de estos animales, se realizó la prueba del laberinto acuático de Morris (Morris et al., 1984), en la que deben aprender a localizar una plataforma sumergida e invisible, que se sitúa en el mismo lugar a lo largo de las cuatro sesiones de adquisición, a partir de señales ambientales o contextuales (aparatos, cuadros o posters del laboratorio, ventanas, ect). En nuestro estudio no tan solo encontramos diferencias entre genotipos, en donde los animales 3xTgAD presentan una peor capacidad para el aprendizaje espacial en el laberinto acuático de Morris, sino que también encontramos diferencias sexuales (tendencia $p < 0.051$), pues las hembras tienden a mostrar una menor eficiencia en el aprendizaje, cosa que ya se había observado en estudios anteriores con estos mismos animales a los 6 meses de edad (Clinton *et al.*, 2007).

Esta peor capacidad para la adquisición de la tarea de aprendizaje espacial de referencia, se refleja a través de una mayor trayectoria o distancia recorrida hasta hallar la plataforma por parte de los animales 3xTgAD, respecto a sus controles (Billings *et al.*, 2005; Giménez-Llort *et al.*, 2007). Este déficit lo muestran otros modelos de EA con la mutación APP695SWE (Adriani et.al, 2006) y otros ratones transgénicos para la APP, como es el caso de los ratones APP23, (Dumont et al., 2004; Lalonde et al., 2002), que también presentan deficiencias en esta tarea de aprendizaje a edades tempranas (3 meses de edad), previas a la aparición de placa de βA (King et al., 1999). Otros autores sugieren que estas formas solubles de βA inducen la pérdida de memoria en edades tempranas (4 y 6 meses de edad) en ratones Tg2576 (Jacobsen *et al.*, 2006; Tabuchi *et al.*, 2009; Westerman *et al.*, 2002).

Asimismo, modelos de ratones doble transgénicos, para APP y PS1, muestran déficits cognitivos que se reflejan en un deterioro en la adquisición y retención de la información espacial (Faure *et al.*, 2011). Además de una mayor distancia recorrida, los animales 3xTgAD también presentan diferencias en velocidad respecto a sus controles (Giménez-Llort *et al.*, 2010, Pietropalolo *et al.*, 2008b). En efecto, los ratones 3xTgAD muestran mayor velocidad de natación que los NTg, como posible reflejo de hiperactividad en estos transgénicos (otras evidencias de dicha hiperactividad se discutirán más adelante en esta sección de la Discusión).

El perfil hiperactivo y el déficit de aprendizaje de los ratones 3xTgAD se asemeja al presentado por otros modelos con mutación en la proteína APP y formación de placa β A, como sería el caso del modelo β APP_{695SWE} y el modelo β APP_{IND}. Los déficits neuroconductuales en estos transgénicos, pueden ser causados por la β A y la acumulación en placa, lo que interferirían en las respuestas cerebrovasculares y en el metabolismo del cerebro (Dumont *et al.*, 2004; Lalonde *et al.*, 2004).

Otro modelo de ratón transgénico para la proteína TAU, como es el modelo P301S, también muestra un perfil hiperactivo y de desinhibición motora (Scattoni *et al.*, 2010). Este animal presenta una mayor velocidad de natación y un mayor nivel de locomoción o de exploración, que se refleja en un incremento de la distancia recorrida durante el primer día de adquisición en el laberinto acuático. El autor sugiere que las anormalidades del comportamiento pueden ser detectadas mucho antes que la aparición de la neurodegeneración, ya a la edad de 3 meses, y esto podría representar un tipo de marcador precoz de la patología (Scattoni *et al.*, 2010).

Las diferencias descritas en la tarea de aprendizaje espacial de referencia durante las sesiones de adquisición, también fueron evidentes en la sesión del test de memoria sin plataforma (o "*probe test*"), administrado 1:30 horas tras la adquisición. Durante esta prueba se cuantifica la retención o memoria de los

animales, evaluando la distancia que recorren en el lugar/cuadrante donde había estado la plataforma en las sesiones de adquisición y el número de cruces realizados a través la posición (o “*annulus*”) donde se hallaba la plataforma sumergida en dicha fase. Encontramos diferencias de genotipo en la capacidad de recordar la posición de la plataforma entre los ratones controles y transgénicos, siendo los animales 3xTgAD los que presentan una menor distancia recorrida en dicho cuadrante y un menor número de cruces a través de la posición exacta donde la plataforma sumergida estuvo colocada. Si observamos la distancia recorrida desde el inicio del test hasta el primer cruce por la posición donde se hallaba la plataforma, encontramos que las hembras 3xTgAD realizan una mayor trayectoria respecto al grupo control no transgénico respectivo. En esta prueba sin plataforma también encontramos una mayor velocidad de natación por parte de los animales transgénicos.

Estos resultados están en concordancia con los que presentan los ratones transgénicos para TAU, como es el caso del modelo P301L, que presentan una discapacidad en la memoria de referencia espacial (Pennanen et al., 2006). Estos animales muestran una disminución en el tiempo pasado en el cuadrante donde estuvo la plataforma y una disminución de cruces sobre la posición donde se hallaba la misma. Este transgénico, a pesar de mostrar una desinhibición motora en términos de conducta exploratoria (tanto en el test de Campo Abierto como en el “*O-maze*”), no presenta diferencias respecto a sus controles ni en velocidad de natación ni en conducta de flotación. Este modelo P301L también desarrolla un deterioro cognitivo a edades tempranas que, al igual que se ha observado en nuestro modelo 3xTgAD, se produce antes de la formación de cualquier placa o patología Tau (Billings et al., 2005).

En la sesión del test de memoria sin plataforma a las 24 horas de finalizar la adquisición, se cuantifica la memoria espacial a largo plazo de los animales, evaluando de nuevo la distancia recorrida en el lugar/cuadrante donde había estado la plataforma y el número de cruces realizados por dicha posición. Los resultados nos vuelven a confirmar que los animales 3xTgAD muestran una

menor preferencia relativa por el cuadrante donde se hallaba la plataforma, es decir, peor retención/memoria a largo plazo.

En el aprendizaje guiado por señales locales (o “*cue task*”), no encontramos diferencias en cuanto a la eficiencia en la tarea, medida por la distancia recorrida hasta alcanzar la plataforma señalizada. En cambio volvemos a encontrar una mayor velocidad de natación por parte de los animales transgénicos. Por tanto, los resultados de estas pruebas nos sugieren que el deterioro de la capacidad de aprendizaje espacial que presentan los animales 3xTgAD, no se puede explicar por una falta de motivación o por alteraciones visuales, ya que en la prueba de la *CUE*, no presentan ningún tipo de problema “grueso” con respecto a sus controles no transgénicos.

Otros estudios, con este modelo de ratón transgénico, no han mostrado déficits cognitivos consistentes en ratones 3xTgAD de 4 meses de edad durante la adquisición de la tarea espacial, pero sí que se han hallado déficits en la retención de la misma a largo plazo (Billings *et al.*, 2005; García *et al.*, 2011). A esta edad se ha publicado que estos animales presentan acumulación de β A a nivel intraneuronal que se inicia tanto en corteza como en el hipocampo (Oddo *et al.* 2003a, b), pero que no presentan acumulación extraneuronal de β A ni otros signos neuropatológicos típicos de la EA hasta los 6 meses de edad (Oddo *et al.*, 2003a; Billings *et al.*, 2005; ver Tabla 2.2, en la “Introducción sobre el modelo triple transgénico”, punto 2.2.3). Esto puede darle más relevancia al presente estudio, dada la escasez de resultados diferenciales (entre ratones controles y 3xTgAD) en tareas cognitivas a esta edad -excepción hecha del trabajo de Billings *et al.* (2005) mencionado-, puesto que podría tal vez significar que la presencia de β A intraneuronal tiene un reflejo funcional a nivel conductual/cognitivo. Si esto es así, como los presentes resultados sugieren, y si se confirma en futuros trabajos, este inicio de las primeras alteraciones en los mecanismos ligados a la β A hipocámpica podría ser ya responsable de anomalías conductuales-cognitivas observables

en determinadas tareas (espaciales o no), condiciones o procedimientos experimentales.

Lo que sí que podemos confirmar es que tanto la hiperactividad, como la desinhibición y el deterioro cognitivo espacial (y no sólo de este tipo) se encuentra tanto en modelos de ratón como en la propia EA en humanos, y que trabajos previos con los animales 3xTgAD han demostrado que presentan síntomas neurológicos y cognitivos a menudo vistos en pacientes de EA (Billings *et al.*, 2005; Clinton *et al.*, 2007; Giménez-Llort *et al.*, 2007; Pietropaolo *et al.*, 2008a,b).

Efectos de la estimulación postnatal

De forma generalizada podríamos decir que los déficits observados en el laberinto de Morris, en nuestros animales 3xTgAD, son parcialmente mejorados por el tratamiento de EP. Este tratamiento de EP reduce de manera significativa tanto la distancia recorrida como la velocidad de natación, mejorando así la eficiencia del aprendizaje espacial en nuestros animales 3xTgAD.

Paradójicamente, en las sesiones de la prueba de memoria sin plataforma a la 1:30 y 24 horas tras la adquisición, el tratamiento de EP disminuye tanto el número de cruces como la distancia recorrida en el cuadrante de la plataforma en los ratones 3xTgAD. En cambio, aumenta el valor de estas variables en el caso de los animales no transgénicos (controles NTg), aumentando así su preferencia por estas áreas. Así que podríamos sugerir que el tratamiento de EP, no es suficiente para compensar la falta de memoria a corto y a largo plazo que encontramos en los animales transgénicos, mientras que sí tiende a mejorar (como sería esperable) la ejecución de la tarea que presentan los NTg. En cambio, la EP sí que es de nuevo eficaz para reducir la velocidad de natación globalmente, que es excesiva en los grupos 3xTgAD de ambos sexos (ver Figura 5.5). Estos resultados son, cuando menos, controvertidos, puesto

que es difícil explicar qué factor (o factores) determina/n que la EP presente efectos positivos en las pruebas de memoria en animales no transgénicos y empeore dichos índices de memoria en los ratones 3xTgAD, a pesar de disminuir –como ocurría en la fase de adquisición de la tarea- la excesiva velocidad de natación de los animales transgénicos.

Aspectos motivacionales/emocionales o sensorimotrices “gruesos” no parece plausible que sean responsables de tales resultados, puesto que en la tarea natatoria “guiada por señales” (CUE; ver Figura 5.8) se observa que no hay efectos significativos de ninguno de los factores (genotipo, sexo o tratamiento) en la eficiencia de aprendizaje, si bien la EP también reduce la velocidad natatoria en los ratones 3xTgAD. Cabe especular que quizá una fase de adquisición de la tarea espacial más prolongada, de tal forma que todos los animales permaneciesen en asíntota durante mayor número de ensayos o días, tal vez podría ofrecer resultados más concluyentes –o menos paradójicos- en las pruebas de memoria sin plataforma. Por otra parte, está claro que serán necesarias otras pruebas de aprendizaje/memoria, espaciales y no espaciales (p. ej. reconocimiento/ discriminación de objetos, laberinto radial, laberinto en “T”, evitación pasiva, etc), en ratones de ambos genotipos y con EP para resolver definitivamente esta paradoja.

De forma general podemos aventurarnos a decir que los animales 3xTgAD tratados con la EP, son más competentes y eficaces en la fase de adquisición de la tarea espacial, bien porque la EP mejora su capacidad cognitiva en relación al procesamiento de las señales contextuales, bien porque la reducción que la EP produce en su aparente hiperactividad, o bien por ambos motivos. No obstante, tal superioridad, inducida por la EP durante la adquisición, no se refleja en las pruebas de memoria en los ratones 3xTgAD. Sin duda, este aspecto merecerá ulteriores estudios.

Es bien conocido que el tratamiento de EP mejora las capacidades cognitivas en roedores (tanto en rata como en ratón) evaluados en distintos paradigmas

experimentales, incluyendo el aprendizaje espacial en el laberinto acuático de Morris (Aguilar *et al.*, 2002a; Escorihuela *et al.*, 1995b; Meaney *et al.*, 1988; Stamatakis *et al.*, 2008; Tremml *et al.*, 2002; Zaharia *et al.*, 1996). No obstante, no hemos hallado en la literatura ningún trabajo en el que se hayan evaluado los efectos de la EP utilizada en este estudio (o similar) en funciones cognitivas en ratones transgénicos para cualquiera de los genes implicados en la neuropatología de la EA. Sin embargo se han obtenido resultados similares, de mejoría producida por la EP, tanto en ratones BALB/c que presentan hipersecreción de corticosterona (Zaharia *et al.*, 1996), como en ratones transgénicos bAPP^{-/-} (mutantes nulos) con baja expresión de la APP (Tremml *et al.*, 2002).

Desde los años 60s del siglo pasado gran número de estudios han mostrado que el tratamiento de EP disminuye la respuesta del eje hipotálamo-pituitario-adrenal (HPA) al estrés a largo plazo, y que estos efectos han sido interpretados como modificadores de la reactividad emocional de los animales, siendo la EP inductora de una reducción en los niveles de ansiedad (Escorihuela *et al.*, 1994b; Fernandez-Teruel *et al.*, 1991, 1992a, 2002; Levine, 1957, 1958; Levine *et al.*, 1957, 1967; Meaney *et al.*, 1987, 1988, 1989, 1996; Núñez *et al.*, 1996; Steimer *et al.*, 1998; Wakshlak *et al.*, 1990). Estos cambios no sólo están causados por la propia manipulación implícita en el tratamiento, sino también por el hecho de que las crías reciben una mayor frecuencia de cuidado y lamido por parte de las madres (Meaney *et al.*, 1988, 1991). También se ha observado que la EP atenúa las respuestas al estrés de los ratones BALB/c y mejora sus capacidades de aprendizaje en el laberinto de Morris (Anisman *et al.*, 1998; Zaharia *et al.*, 1996).

Se ha observado que el estrés excesivo o el exceso de GCs (por una elevada actividad del eje HPA) empeoran la ejecución cognitiva e incrementan (acelerando y/o anticipando) la aparición de signos neuropatológicos típicos en varios ratones transgénicos para la EA. Así, determinados tipos de estrés o el exceso de GCs potencian la acción de factores (como b-APP, BACE, etc)

involucrados en la generación de depósitos neurotóxicos de β A (Dong *et al.*, 2004; Green *et al.*, 2006; Jeong *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2010; Markham *et al.*, 2010; Querfurth y LaFerla 2010; Yao *et al.*, 2007), al tiempo que reducen la neurogénesis y la neuroplasticidad en el hipocampo (Berger *et al.*, 2006; Lemaire *et al.*, 2006; Pham *et al.*, 2003; Rodríguez *et al.*, 2008; Xi *et al.*, 2011).

La mayor eficacia que presentan los animales precozmente estimulados con el tratamiento de EP en retornar el eje HPA a su funcionamiento basal tras un estrés, se explicaría como un incremento de la eficacia en el control del “*feedback*” negativo del eje HPA durante el estrés (Meaney *et al.*, 1985, 1988; Sapolsky *et al.*, 1985), y podría estar mediada por una mayor sensibilidad de las neuronas del hipocampo a los glucocorticoides circulantes, así como por un número superior de receptores para los glucocorticoides en esta área (Ferrer *et al.*, 1994; Nuñez *et al.*, 1996; Steimer *et al.*, 1998; Zou *et al.*, 2001). De hecho, se ha visto que la EP produce un incremento en el número de dichos receptores (Meaney *et al.*, 1989; Sarrieau *et al.*, 1988; Stamatakis *et al.*, 2008). Por lo tanto, un aumento en el número de receptores conduciría a niveles de corticoides circulantes más bajos, retrasándose la aparición de problemas de aprendizaje, déficits de memoria y muerte neuronal en el hipocampo (Meaney *et al.*, 1987, 1988, 1989, 1991).

A su vez, la reducción de GCs excesivos es protectora respecto a la aparición de los síntomas neuropatológicos de la EA en ratones. Así, tratamientos típicos antidepresivos y anti-estrés, como la Fluoxetina (Prozac^R) o la Paroxetina (Paxil^R), que reducen los niveles de glucocorticoides (Finn *et al.*, 2003; Gartside *et al.*, 2003; Gómez *et al.*, 1998; Jackson *et al.*, 1998), previenen los efectos neuropatológicos inducidos por estrés, retrasan la aparición de déficits cognitivos y de la patología amiloide y de Tau en modelos animales para la EA (incluido el ratón 3xTgAD, ver Dong *et al.*, 2004; Green *et al.*, 2006; Jeong *et al.*, 2006; Markham *et al.*, 2010; Nelson *et al.*, 2007), y producen un incremento de la neurogénesis (Berger *et al.*, 2006; Lemaire *et al.*, 2006; Xi *et al.*, 2011).

Se han observado disfunciones neuroquímicas en cerebros de pacientes con EA, que incluyen niveles reducidos de neurotransmisores como la acetilcolina o la serotonina (Gsell et al., 2004), así como también se ha constatado el efecto del historial depresivo como un factor de riesgo para la EA (Ownby et al., 2006).

Varios estudios epidemiológicos relacionan la depresión con la enfermedad de Alzheimer, ya que ambas comparten tanto mecanismos moleculares como vías fisiopatológicas en parte comunes (Caraci et al., 2010; Aznar et al., 2011). Los síntomas depresivos se asocian a un mayor riesgo de desarrollar la EA, lo que plantea la cuestión de si tales síntomas pueden ser una manifestación de sutiles cambios neuropatológicos asociados con la EA precoz. Ambos autores sugieren que una hiperactivación del eje HPA, así como la inflamación crónica y el déficit de señalización de neurotrofinas, pueden ser considerados como los mecanismos fisiopatológicos comunes entre la depresión y la enfermedad de Alzheimer. Asimismo sugieren que esos dos mecanismos podrían utilizarse como nuevas dianas predictivas en la progresión de la depresión hacia la EA, así como para la identificación de etapas tempranas de la EA y para el tratamiento farmacológico de estos dos trastornos (Caraci et al., 2010). La hipótesis propuesta por Aznar et al. (2011) se basaría en la disfuncionalidad genética de uno o de varios de los sistemas cerebrales implicados en la adaptación o regulación del estrés. Tal disfunción cursaría con un aumento de GC's, que iniciarían un proceso perjudicial en cascada, proceso que finalizaría con el mal funcionamiento del sistema serotoninérgico y el colinérgico, así como con la reducción del volumen del hipocampo y de la plasticidad cerebral. Estos cambios aumentarían la vulnerabilidad del cerebro a los efectos negativos de la respuesta del estrés, incrementando la disfunción cognitiva y el riesgo del desarrollo de la neuropatología de la EA (Aznar et al., 2011).

La reducción de la actividad serotoninérgica puede promover una disfunción sináptica y muerte neuronal en la EA (Mattson, 2004). También se conoce que las neuronas serotoninérgicas procedentes de los núcleos del rafe

proporcionan una entrada masiva a estructuras corticolímbicas que participan en el control de los estados ansiosos, la impulsividad y procesos cognitivos (Costall et al., 1989; Millan et al., 2003). Asimismo, encontramos múltiples estudios que sugieren que los sistemas aminérgicos centrales pueden estar relacionados, ya sea directa o indirectamente, con la mediación de conductas ansiosas (p. ej. Boix et al., 1990; Handley et al., 1993). Así, los mencionados efectos positivos de los fármacos antidepresivos en modelos de ratones para la EA, parecen guardar coherencia con lo anterior. Además, no puede descartarse que los efectos del tratamiento con EP, observados aquí, puedan en parte estar mediados por acciones del tratamiento sobre la transmisión serotoninérgica ya en estadios tempranos del desarrollo, pues, como han mostrado diferentes estudios (Fernández-Teruel *et al.*, 2002; Meaney *et al.*, 1989; Mitchell *et al.*, 1990, 1992; Stamatakis *et al.*, 2008; Zanettini *et al.*, 2010), los efectos de la EP sobre la serotonina pueden mediar sus consecuencias a largo plazo sobre la actividad del eje HPA y los receptores de GCs centrales (especialmente los hipocámpicos).

A la luz de lo anterior, parece plausible suponer que la EP pudiese estar paliando (o retrasando) la aparición de los déficits cognitivos -y quizá de los signos neuropatológicos- en los ratones 3xTgAD por su (ya demostrada) acción anti-estrés a largo plazo tanto a nivel conductual como, a través de alguno de los mecanismos apuntados arriba, por la reducción de la actividad del eje HPA y el aumento de los receptores de GCs hipocámpicos (Levine *et al.*, 1967; Meaney *et al.*, 1988, 1989). Como hemos visto en párrafos anteriores, si la EP estuviese produciendo dichos efectos, la menor función (o funcionamiento más “correcto” o eficaz) del eje HPA podría modular aspectos moleculares vinculados al procesamiento de la APP, el β A y/o enzimas relacionados, como sería el BACE (Dong *et al.*, 2004; Green *et al.*, 2006; Jeong *et al.*, 2006; Mattson, 2004). El resultado final podría ser una disminución de la acumulación de aquellas proteínas o enzimas, con el consecuente retraso en la aparición de los primeros signos neuropatológicos, tales como los déficits de función sináptica –hipocámpica- tempranos, observados en este modelo

3xTgAD a los 4 meses de edad (LaFerla y Oddo, 2005), o/y la acumulación de β A a nivel intraneuronal.

Aunque lo expuesto parece una hipótesis (o secuencia de hipótesis) plausible, en función de lo que se conoce sobre los efectos a largo plazo de la EP tanto a nivel conductual/cognitivo como a nivel del eje HPA, de ciertos neurotransmisores y de los efectos neurales relacionados, es obvio que serán necesarios estudios que verifiquen cada uno de los aspectos hipotéticos apuntados arriba. En cuanto a si la EP ha producido efectos sobre los procesos neuropatológicos incipientes en los ratones 3xTgAD, que pudiesen relacionarse con los efectos cognitivos hallados aquí, también queda pendiente de confirmar.

En nuestro laboratorio se hallan en curso estudios en los que podrá verificarse tal hipótesis, dado que se están investigando los efectos de la EP en estos ratones transgénicos, a edades más avanzadas, tanto a nivel cognitivo/emocional como de la neuropatología de β A.

5.3.2. Inhibición conductual ante la novedad, ansiedad incondicionada y conducta exploratoria en ratones 3xTgAD: efectos de la estimulación postnatal

Nuestra hipótesis es que el perfil de los ratones 3xTgAD muestra un comportamiento que puede corresponder a los cambios de la personalidad temprana observados en la EA en humanos, incluyendo el aumento de la ansiedad y la conducta perseverante (Scattoni *et al.*, 2010). Antes de iniciar el estudio conductual y aprovechando el cambio de viruta semanal, realizamos una vez cada mes, la prueba de neofobia (test de las esquinas) y un control del peso de los animales (desde los 2 hasta los 5 meses de edad). Las medidas del peso muestran un claro dimorfismo sexual, siendo los machos los que

presentan un peso mayor. También indican que con la edad aumenta el peso, que los ratones 3xTgAD muestran un mayor peso global y que el tratamiento de EP induce un incremento del peso en todos los grupos. El mayor peso de los animales 3xTgAD respecto a los NTg, así como las diferencias sexuales comentadas, se han observado también en otros estudios realizados en nuestro laboratorio con este mismo ratón transgénico (García *et al.*, 2011; Giménez-Llort *et al.*, 2007, 2010) y en otros modelos animales para la EA (Lalonde *et al.*, 2003b).

Inhibición conductual ante la novedad

Como ya observamos en el “Estudio I” del presente trabajo, el test de neofobia –o *corner test*– nos indica una mayor temerosidad en una situación que presenta elementos de novedad para los ratones (Arranz *et al.*, 2009; Giménez-Llort *et al.*, 2007, 2010). En este estudio, repetimos la prueba del *corner test* a los 2, 3 y 4 meses de edad, y encontramos una evidente habituación al test (disminución del número de esquinas exploradas) en función de la edad, es decir, en función de las repeticiones. El tratamiento de EP muestra una clara tendencia a aumentar el número de esquinas exploradas en los ratones 3xTgAD (de ambos sexos) a las tres edades, así como un efecto globalmente contrario en los animales no transgénicos, especialmente en el primer test (a los 2 meses de edad). Si observamos tan solo la conducta exploratoria que presentan los animales a los 2 meses de edad (primer contacto con el test), aparece un efecto del genotipo en machos, indicativo de que los 3xTgAD presentan sistemáticamente niveles superiores de inhibición conductual al compararlos con sus respectivos NTg. Esto nos indica que a edades juveniles estos animales 3xTgAD presentan mayor neofobia, incluso en una situación en la que puede considerarse que la novedad implicada es leve. En cualquier caso se puede considerar que este efecto está en línea con otros resultados de nuestro laboratorio en los que se ha observado una marcada inhibición conductual en los ratones 3xTgAD (en relación a los NTg) a la edad

de 2.5 meses (Blázquez 2006; Giménez-Llort *et al.*, 2007) en la prueba del Campo Abierto.

La actividad en el Campo Abierto (CA) es considerada como un índice de actividad motora/exploratoria influida por componentes emocionales de reactividad ante la novedad de la situación, de tal forma que la conducta exploratoria en el test de CA se asume que depende en parte de la neofobia que el sujeto experimenta (Broadhurst, 1975; Crawley, 1985; DeFries *et al.*, 1970; Denenberg, 1969; Denenberg *et al.*, 1969; Streng, 1971).

En relación a los ratones NTg, los animales 3xTgAD muestran una mayor inhibición conductual en respuesta a la novedad (como probable reflejo de miedo/ansiedad) y tienden a permanecer mayor tiempo en el centro del aparato (inmovilidad inicial o *freezing*), lo que se refleja en una latencia significativamente mayor de salida del centro hacia la periferia del CA.

Si observamos la variable de “tiempo de conducta de petrificación” o *freezing* (CA-freez) en la prueba del campo abierto y la correlacionamos con la variable de “tiempo de salida del centro” (CA-centro), podemos observar como estas dos conductas correlacionan intensa y positivamente (ver Tabla 5.2), lo que claramente indica que estas dos variables van en el mismo sentido de representar reactividad emocional/inhibición conductual ante un espacio nuevo. Por tanto, la interpretación más plausible de las diferencias en “tiempo de salida del centro” en el CA es la de que dicha conducta refleja que los ratones 3xTgAD están más tiempo “semi-petrificados” como efecto de la neofobia o miedo. En cambio, el análisis factorial de las dos variables anteriores (CA-freez y CA-centro) junto a los totales de actividad horizontal y vertical (CA-cross y CA-rear) en los 5 minutos de la prueba de Campo Abierto, separa conceptualmente estas variables en dos grupos, conformando por una parte un factor que indicaría claramente “actividad exploratoria total” y otro factor separado de “inhibición conductual ante la novedad” (ver análisis factorial en Tabla 5.3 y 5.4).

Aunque los roedores tienden a explorar su entorno para conocerlo y asegurar la disponibilidad de los recursos necesarios como la comida y la bebida, estos animales han aprendido a protegerse de los predadores evitando los espacios abiertos e iluminados, y por eso tienden a evitar el centro de los espacios abiertos, tanto en condiciones de luz como de oscuridad. Se acepta, en general, que aquellos animales que deambulan más por el centro del campo abierto son menos temerosos (Archer, 1973; Gray, 1979; Walsh y Cummins, 1976). Nuestros resultados en la prueba del campo abierto son coherentes con estas afirmaciones, ya que en el presente trabajo todos los grupos de ratones realizaron una mayor actividad en la periferia que en el centro del campo abierto, independientemente del tratamiento ambiental recibido. Los animales transgénicos muestran una menor exploración horizontal y vertical (*rearing*) que los ratones NTg. En el caso de los machos 3xTgAD, incluso muestran una menor actividad exploratoria durante el primer minuto de exposición al test. Esta reducción de la actividad exploratoria es coincidente con los resultados de otros estudios en este mismo modelo transgénico (Giménez-Llort *et al.*, 2007 y 2010; Sterniczuk *et al.*, 2010b).

Es difícil determinar el efecto preciso que sobre la actividad produce la sobreexpresión de APP en los animales transgénicos, ya que existen resultados opuestos en la literatura. Muchos de los estudios sugieren que, utilizando la prueba de campo abierto, ratones con sobreexpresión de APP, tanto si portan la mutación *Swe*₆₉₅ como la mutación *London*_{V642I}, pueden mostrar un aumento en los niveles de actividad. Sin embargo, también existen resultados de animales transgénicos APP que muestran cambios mínimos en la actividad locomotora (Lee *et al.*, 2004; Pugh *et al.*, 2007; Touma *et al.*, 2004b).

Por otra parte, se conocen bien los efectos beneficiosos que ejerce el tratamiento de estimulación postnatal (EP) sobre la emotividad mostrada por roedores en el campo abierto y otras situaciones de novedad que dependan en alguna medida de la actividad locomotora (ver revisiones en Fernández-Teruel

et al., 1997, 2002; Gariépy et al. 2002; Macri et al., 2008; Tremml et al., 2002, Zanettini et al., 2010). De ahí que esperásemos encontrar una menor respuesta emotiva/neofóbica, que viniese reflejada como un incremento en la actividad realizada por estos ratones transgénicos con EP, pero en nuestro estudio dicho aumento es más marcado en los animales no transgénicos.

Desinhibición conductual y conducta exploratoria

El laberinto en cruz elevado (PM), es una prueba muy utilizada para evaluar la conducta ansiosa de roedores, de manera que la conducta en los brazos abiertos es indicativa de menores niveles de emotividad o de ansiedad del animal (Pellow y File, 1986). El PM es un test considerado válido, tanto farmacológica como etológicamente, para la medida de la ansiedad en roedores, que utiliza estímulos naturales similares a algunos de los que pueden inducir ansiedad en humanos (Dawson *et al.*, 1995; Pellow y File, 1986; Rodgers y Dalvi *et al.*, 1997).

En nuestro estudio no se produjeron efectos netamente significativos en las variables típicas de ansiedad medidas en el PM, como serían el “porcentaje de entradas en los brazos abiertos” o el “porcentaje de tiempo pasado en los brazos abiertos”. Resultados similares se han obtenido tanto en nuestro laboratorio como en otros estudios que utilizan este modelo (Giménez-Llort *et al.*, 2007; Pietropaolo *et al.*, 2008a). Tan sólo encontramos un efecto del sexo en la variable “porcentaje de tiempo en los brazos abiertos”, siendo los machos 3xTgAD los que presentan valores superiores en dicha medida. Incluso podemos observar como muestran una tendencia a presentar un mayor número de entradas respecto a sus controles macho NTg, efecto que también se presenta en otro estudio realizado con estos animales a los 6 meses de edad (Pietropaolo *et al.*, 2009).

Estas diferencias sexuales aparecen en diferentes variables del PM, que globalmente sugieren que los machos 3xTgAD muestran consistentemente una

mayor actividad motora exploratoria en una situación de novedad como es este test. Este comportamiento se refleja tanto por un mayor número de entradas a los brazos abiertos como por un mayor tiempo pasado en dichos brazos. Así que, estos machos 3xTgAD no únicamente muestran una conducta de desinhibición o de mayor curiosidad respecto a las hembras transgénicas, sino que también respecto al grupo de machos controles NTg. Se considera que a mayor cantidad de conducta exploratoria en los brazos abiertos del PM se corresponderían niveles de ansiedad más bajos, ya que se ha observado que tanto los ansiolíticos, como las benzodiazepinas y dosis bajas de alcohol, aumentan la conducta en los brazos abiertos, mientras que los fármacos ansiogénicos disminuyen dicha conducta (Pellow y File, 1986).

Por otra parte, las hembras transgénicas muestran un menor número de entradas en los brazos cerrados respecto a sus respectivas NTg. Estudios realizados con estos animales en otros laboratorios muestran también diferencias sexuales en el PM, siendo las hembras 3xTgAD las que presentan un menor porcentaje de tiempo pasado en los brazos abiertos respecto a sus controles NTg (Pietropaolo et al., 2009). Así que podríamos concluir, en función del presente y de otros estudios, que los machos 3xTgAD se muestran más activos, desinhibidos y aparentemente menos ansiosos que sus respectivos controles NTg y que las hembras 3xTgAD.

Estos resultados son consistentes con trabajos previos con diferentes modelos de animales que sobreexpresan la β AAPP, como son los ratones APP23 (APP₇₅₁; Lalonde et al., 2002, 2003a) y los ratones Tg2576 (APP₆₉₅, Ognibene et al., 2005), que muestran una tendencia a la desinhibición conductual en la prueba del PM a diferentes edades.

En la literatura encontramos una gran variedad de resultados sobre la conducta que presentan los animales que sobreexpresan la doble mutación para los transgenes APP y PS1 (Arendash et al., 2001). Mientras que este autor no encuentra ningún efecto de los transgenes sobre los niveles de ansiedad, otros

estudios más recientes (Jensen *et al.*, 2005) indican una disminución de la ansiedad de estos ratones APP/PS1 en el PM, incluso en ambos sexos (Pugh *et al.*, 2007). Un análisis más detallado de la actividad locomotora de estos animales APP/PS1 indica que sus respuestas ante un ambiente nuevo se caracterizan por mostrar mayores niveles de actividad (Pugh *et al.*, 2007).

Un nuevo modelo de ratón, llamado APP/PS1-Ki, presenta un perfil de conducta hiperlocomotora (observable en el test de campo abierto, en actimetría –medida de actividad basal- y en el PM) y signos de desinhibición (Faure *et al.*, 2011).

Este comportamiento de desinhibición, en cuanto a la conducta exploratoria, también se observa en ratones transgénicos para la proteína Tau P301L, a los 6 y 11 meses de edad, tanto en el test de campo abierto como en el laberinto circular elevado (Pennanen *et al.*, 2006; Scattoni *et al.*, 2010). En este mismo modelo transgénico, dicho perfil hiperactivo se ha observado ya en etapas juveniles (a las 9 semanas de edad) en la prueba de campo abierto (Boekhoorn *et al.*, 2006).

Otro modelo de ratón transgénico para la proteína Tau P301S, muestra también conducta desinhibida e hiperactividad (Scattoni *et al.*, 2010). Además, un estudio con ratones transgénicos para la proteína Tau V337M que expresa el transgén sólo en el hipocampo, muestra aumento tanto de la actividad locomotora/exploratoria en el PM como un aumento de la locomoción en el CA, pero en cambio no presenta un deterioro significativo en el aprendizaje espacial en el laberinto de Morris (Tanemura *et al.*, 2002).

En suma, la conducta desinhibida en diferentes situaciones/tests de novedad y/o ansiedad, la podemos encontrar en un abanico amplio de animales transgénicos portadores de cualquiera de las tres mutaciones que presenta nuestro modelo 3xTgAD.

El tratamiento de EP parecería que muestra un efecto reductor de la ansiedad en el PM en todos los grupos experimentales, como podría interpretarse por la disminución de la latencia de entrada a los brazos abiertos. No obstante, se observa que la EP aumentó tanto el número total de entradas a los brazos abiertos como de los brazos cerrados en ambos sexos, pero no así los porcentajes de entradas o de tiempo en los brazos abiertos. En conjunto, por tanto, puede interpretarse que en nuestro experimento la EP presenta un efecto desinhibido de la conducta, pues aumenta la actividad exploratoria en el test PM, pero sin afectar de forma concluyente las medidas típicas de ansiedad en dicho test.

El test de la tabla de agujeros de “Boissier” es una prueba que mide la curiosidad aprovechando la tendencia natural de los ratones a explorar los agujeros del suelo, aunque no puede olvidarse que el número de exploraciones puede depender también de la actividad locomotora inespecífica. Este test, también se halla influido por un componente de reactividad emocional, debido a la novedad de la situación (Barbier *et al.*, 1991; File y Wardill, 1975).

De nuevo, aparecieron diferencias sexuales entre los grupos en la tabla de agujeros, siendo los machos 3xTgAD los que presentan conducta desinhibida (o de mayor curiosidad) no tan sólo respecto a las hembras 3xTgAD, sino también respecto al grupo de machos controles NTg. Esta conducta no únicamente refleja un mayor número de exploraciones de agujeros sino también que los animales transgénicos dedican más tiempo a explorar dichos agujeros. De hecho, se han obtenido resultados similares en ratones trisómicos (modelo animal de la trisomía 21 humana; Escorihuela *et al.*, 1995c), indicativos de que la mayor conducta exploratoria de los mismos posiblemente dependa de un incremento en la actividad inespecífica. Es decir, no se trataba de mayor curiosidad sino, también, de hiperactividad no dirigida (Escorihuela *et al.*, 1995c; Martínez-Cúe *et al.*, 2002).

Globalmente no encontramos ningún efecto del tratamiento de EP en la conducta de los animales en la tabla de agujeros. Así que, podríamos decir que los resultados conductuales observados en la tabla de agujeros de Boissier van en la misma dirección que los datos obtenidos en el laberinto en cruz elevado, y que apuntan consistentemente a una mayor actividad y/o desinhibición conductual de los machos 3xTgAD ante situaciones de novedad, así como a una respuesta más emotiva (tendente a la inhibición conductual locomotora) por parte de las hembras transgénicas.

Una tercera prueba que nos permite evaluar conductas emotivas o ansiedad es el test de la caja blanca/negra (DLB). Esta prueba, basada en la preferencia innata de los roedores por lugares oscuros y la aversión por los iluminados, es sensible a tratamientos con fármacos ansiolíticos (Belzung *et al.*, 2000; Crawley *et al.*, 1997; Griebel *et al.*, 2000). Se consideran buenos indicadores de la conducta ansiosa en este test la latencia de entrada (al compartimento blanco/iluminado), el tiempo pasado en el compartimento claro y el número de transiciones entre ambos compartimentos (Yuk *et al.*, 2009).

Vuelven a aparecer diferencias de sexo entre los grupos experimentales en este test. Y, de nuevo, los machos 3xTgAD presentan conducta desinhibida o de mayor curiosidad respecto a las hembras 3xTgAD, así como también respecto al grupo de machos controles NTg. Esta conducta se traduce en un mayor número de entradas al compartimento blanco, un mayor tiempo pasado en el mismo, así como una mayor actividad exploratoria una vez dentro del compartimento blanco. Un estudio realizado con estos mismos animales 3xTgAD en nuestro laboratorio, y que muestra el efecto del ejercicio moderado, informa de conducta desinhibida en las hembras 3xTgAD con y sin tratamiento en la prueba de DLB (Giménez-llort *et al.*, 2010). También en nuestro laboratorio, esta misma conducta desinhibida se ha observado en animales 3xTgAD macho de 6 meses de edad (Giménez-Llort *et al.*, 2007), y es completamente consistente con la reducción de la conducta ansiosa, en la DLB y en el PM, observada en los ratones transgénicos que expresan la mutación

PS2 (N1411), los cuales presentan un aumento en el tiempo pasado en el compartimento claro/iluminado y un mayor número de desplazamientos entre ambos compartimentos (Yuk *et al.*, 2009).

Respecto al efecto que ejerce el tratamiento de EP en la DLB, globalmente no se hallaron consecuencias sobre la conducta de los machos 3xTgAD. Sin embargo, sí que se observa como la EP tiende a reducir la conducta ansiosa de las hembras 3xTgAD, en términos de incrementar moderadamente (aunque las interacciones “genotipo x tratamiento” son significativas; ver “Resultados” de este estudio) el tiempo que transcurren en el compartimento blanco y reducir el tiempo que tardan en entrar en el mismo por primera vez (véase Fig. 5.13).

En resumen, la práctica totalidad de los trabajos revisados que utilizan ratones transgénicos para alguno de los genes (o combinación de los mismos) de la EA, así como el triple transgénico 3xTgAD, parecen presentar una predominante tendencia a la conducta desinhibida o a la hiperactividad en diferentes situaciones que implican novedad, como el test de Campo Abierto (con la excepción del presente trabajo), el PM, la DLB o la tabla de agujeros. Dicha tendencia a la conducta desinhibida no siempre es consistente con una disminución de la ansiedad, puesto que en muchos casos las variables/medidas más típicas de ansiedad (p. ej. los porcentajes de entradas o de tiempo en brazos abiertos del PM) no presentan valores diferentes entre ratones transgénicos y sus controles. De hecho, será precisa más investigación respecto a los niveles de ansiedad/miedo de los ratones 3xTgAD, a otras edades y en otras situaciones o tareas (p.ej. tareas condicionadas), puesto que los resultados obtenidos en diferentes estudios y laboratorios están aún lejos de ofrecer un escenario consistente (compárese el presente estudio con p.ej. Giménez-Llort *et al.*, 2007, Sterniczuk *et al.*, 2010b; España *et al.*, 2010).

El tratamiento de EP parece inducir, como efecto más genérico, un incremento de la desinhibición conductual (o, quizá, reducción de la ansiedad) que se manifiesta principalmente en forma de reducciones de las latencias de entrada a los brazos abiertos del test PM en ambos genotipos y ambos sexos, incremento del número de entradas en los brazos abiertos del test PM también en ambos genotipos y sexos, así como un incremento del tiempo transcurrido en el compartimento blanco de la DLB en las hembras 3xTgAD.

5.3.3. Hiperactividad en ratones 3xTgAD y efectos de la estimulación postnatal

Actividad motora espontánea durante 24 horas.

Durante varias décadas, el impacto de la EA en las habilidades cognitivas han sido el principal punto de interés en la investigación sobre la enfermedad de Alzheimer. Sin embargo, en los últimos años, muchos estudios se han centrado en el estudio de los síntomas conductuales y psicológicos de la demencia (SCPD), con especial atención en los patrones de actividad y alteraciones del ritmo circadiano en pacientes con EA (Volicer *et al.*, 2001; Witting *et al.*, 1990).

La caracterización conductual llevada a cabo en nuestro laboratorio ha revelado que los ratones 3xTgAD presentan una reducida conducta exploratoria horizontal y/o vertical en el test de Campo Abierto, a los 2.5 (previo a la formación de beta-amiloide), 6 y 12 meses de edad, así como conducta neofóbica (en el “corner test”) a los 12 meses de edad y déficits en aprendizaje espacial a los 6 y 12 meses de edad (Blázquez 2006; Giménez-Llort *et al.*, 2007). Los resultados de actividad espontánea diurna en situación basal (mínima novedad), muestran hiperactividad en los ratones 3xTgAD de 12 meses de edad en la primera hora de test (Giménez-Llort *et al.*, 2007). Es conocida la correlación existente entre los déficits cognitivos y la patología de la β A intraneuronal que se inicia en la región CA1 de hipocampo, pero que

también es visible en corteza y amígdala a los 4 meses de edad (Oddo *et al.*, 2003a; Billings *et al.*, 2005). Incluso se ha observado inmunoreactividad de la β A en hipocampo a los 2 meses de edad (Mastrangelo y Bowers, 2008). Por los motivos anteriores nos planteamos que sería importante estudiar el ciclo circadiano de actividad basal a la edad de 4 meses, que es cuando existen evidencias del inicio del proceso neuropatológico a nivel intraneuronal.

Al igual que en el “Estudio I” del presente trabajo, es importante recordar que la fase activa de los ratones sucede durante la fase de oscuridad, al contrario que en los seres humanos. El estudio de la actividad locomotora espontánea durante 24 horas, en estos animales de 4 meses de edad, nos indica lo siguiente:

1. A pesar de que ambos genotipos presentan una mayor actividad durante la fase oscura, los machos 3xTgAD en particular, muestran una hiperactividad locomotora durante esta fase de oscuridad respecto a los controles NTg.
2. Tan sólo aparece un efecto asociado al sexo durante los primeros 30 minutos de la fase de luz, siendo globalmente los machos los que presentan una mayor actividad. Pero tanto machos como hembras 3xTgAD muestran significativamente mayor actividad que sus respectivos NTg.

Durante los primeros 30 minutos de exposición al test, en fase de luz, todos los grupos presentan un pico en la actividad, pero se va reduciendo con el paso del tiempo, por el efecto de la habituación exploratoria (Ganea *et al.*, 2007). Durante estos primeros 30 minutos de exposición al test se hallan ya diferencias entre los genotipos, y curiosamente, son los animales 3xTgAD los que presentan una mayor actividad locomotora respecto a sus controles NTg. Resultados similares se han obtenido con animales de 6 y 12 meses de edad (Giménez-Llort *et al.*, 2007) durante los 5 primeros minutos o la primera hora

de exposición a las cajas de actividad (con las mismas condiciones ambientales que en el presente estudio).

Podríamos considerar que, en nuestro estudio, todos los grupos muestran un ritmo circadiano bien definido, en donde el mayor pico de actividad se presenta generalmente durante la fase de oscuridad. Este patrón de actividad lo podríamos definir como dentro de la normalidad (Ambree *et al.*, 2006; Ganea *et al.*, 2007). Pero encontramos dos grupos con patrones especiales y remarcables:

1. Por una parte, los machos 3xTgAD sin tratamiento, parecen estar continuamente despiertos e hiperactivos durante la fase de oscuridad (ver Fig. 5.14A).
2. Los machos NTg que han recibido el tratamiento de EP, presentan un patrón estable durante todo el ciclo circadiano, pues no parecen mostrar ni habituación de la actividad durante la fase de luz ni un incremento de la misma durante la fase de oscuridad (ver Fig. 5.14A).

Esta hiperactividad locomotora en fase de oscuridad, que presentan los machos 3xTgAD, también se encuentra descrita en la literatura en un modelo de APP23 (Van Dam *et al.*, 2003), que estudia la actividad de estos animales en su propia jaula en edades jóvenes (6-8 semanas, 3 meses y 6 meses de edad). Otro estudio sobre los niveles de la actividad locomotora espontánea en condiciones basales confirma que los ratones Tg2576 (APP_{SW}) son más activos que sus controles (Ognibene *et al.*, 2005) y que a la edad de 3 meses este mismo transgénico presenta hiperactividad locomotora (King *et al.*, 1999).

El modelo de doble transgénico de APP-PS1, muestra hipoactividad tanto en tareas/pruebas específicas de corta duración (30 minutos en caja de actividad tipo CA) como durante todo el período de luz. En cambio si se observa su conducta durante un período de 24 horas, los animales macho de 5 y 10

meses y las hembras de 10 meses de edad, muestran hiperactividad locomotora (Phugh *et al.*, 2007).

Un estudio ha demostrado la implicación de la β A en la regulación de la actividad circadiana, a través de injertos en cerebro de rata con sobreexpresión de β A (Tate *et al.*, 1992). Por tanto, a la luz de lo anterior, la hiperactividad que en general y en condiciones basales se observa en la mayor parte de ratones transgénicos utilizados como modelos de la EA (referencias anteriores) y en el estudio presente, parecería ser consistente con la mencionada implicación del beta-amiloide en la locomoción.

También encontramos hiperactividad en los ratones trisómicos Ts65Dn (modelo de Síndrome de Down que desarrollan neuropatología beta-amiloide) respecto a sus controles en el test de campo abierto durante la fase oscura del fotoperiodo (Coussons-Read y Crnic, 1996; Escorihuela *et al.*, 1995c; Holtzman *et al.*, 1996; Reeves *et al.*, 1995). Estos autores asocian la hiperactividad, observada durante la fase oscura en estos ratones trisómicos, a una incapacidad para inhibir la conducta, y sugieren que de alguna manera se puede deber a un funcionamiento inadecuado de la corteza prefrontal.

El efecto del tratamiento de EP varía dependiendo del genotipo. Así, en el caso de los animales 3xTgAD, la EP reduce claramente la hiperactividad que presentan los machos durante la fase nocturna (ver Fig. 5.14A y 5.14E), la actividad total e incluso la presentada durante la primera media hora del test, reduciendo la actividad locomotora hasta niveles similares a los observados en el grupo control NTg. En cambio el efecto que produce la EP en los animales control NTg es opuesto, incrementando la actividad locomotora, en especial durante los primeros 30 minutos.

Tales efectos de la EP, principalmente la normalización de la hiperactividad observada en los ratones 3xTgAD, sugieren que dicha actividad excesiva es anómala, tal vez vinculada a incipientes procesos o alteraciones relacionadas

con el beta-amiloide (que a esta edad empieza a acumularse a nivel intraneuronal; ver Fig. 6.1. -fotos de acumulación de beta-amiloide en estos mismos ratones 3xTgAD de 4 meses- en la sección siguiente, “Discusión general”), que podrían verse contrarrestados por la estimulación postnatal. Esta es una sugerente hipótesis, en nuestra opinión, que deberá confirmarse en futuros estudios con EP en estos transgénicos, e idealmente deberían también evaluarse en edades más avanzadas tanto a nivel cognitivo (al margen de otros aspectos conductuales, o SCPD) como neuropatológico. Estudios dirigidos a tal fin se están realizando en nuestro laboratorio.

Cambios en el peso corporal

Al igual que en el Estudio I, el efecto del aislamiento y la exposición a la novedad durante 24 horas provocó pérdidas de peso en los animales. Y en concordancia, la pérdida de peso también fue relativamente mayor en los ratones 3xTgAD. También encontramos un claro dimorfismo sexual en esta edad, siendo los machos los que presentan un peso mayor respecto a las hembras. Este aumento de peso por parte de los animales 3xTgAD, así como las diferencias sexuales, se observado además en otros en estudios de nuestro laboratorio (García *et al.*, 2011; Giménez-Llort *et al.*, 2007, 2010). Por otra parte, el tratamiento de EP produce un aumento de peso en todos los grupos experimentales.

Actividad locomotora en un contexto más etológico: laberinto hexagonal en túnel

Bättig *et al.* (1976) idearon y describieron el laberinto hexagonal en túnel como una serie de callejones (túneles) interconectados y concéntricos, para el estudio de la actividad locomotora, respuestas de miedo/ansiedad y función cognitiva (aprendizaje, memoria) en ratas, en ausencia de recompensas o castigos (Fitzgerald *et al.*, 1988). Así que, para examinar más a fondo la

conducta hiperactiva que presentaban estos animales, introdujimos dentro de la batería conductual la prueba del laberinto en túnel radial de 6 brazos.

La estructura de este laberinto oscuro, permite que los animales se desplacen libremente y puedan explorar los diferentes túneles de forma espontánea, reproduciendo las características de una madriguera y proporcionando así un contexto más etológico (Oettinger *et al.*, 1985; Giménez-Llort *et al.* 2005), sin (o con menos) intervención de la ansiedad/emotividad.

En nuestro estudio, nos limitamos a estudiar la actividad locomotora o distancia recorrida durante los 6 minutos que duró el test, así como el tiempo que tarda el animal en explorar los seis brazos diferentes. A pesar de encontrar diferencias de género, indicativas de que los machos muestran en general mayor actividad que las hembras, el efecto significativo del “genotipo” muestra que los animales 3xTgAD recorren mayores distancias que sus respectivos controles NTg.

Respecto al tiempo empleado para explorar los seis brazos diferentes, encontramos que los animales 3xTgAD tardan globalmente menos tiempo en explorar por completo los 6 brazos respecto a sus controles NTg. Así que, podríamos concluir que los animales 3xTgAD realizan una mayor distancia en un menor tiempo, lo que es consistente con una mayor velocidad locomotora, y es congruente a su vez con los resultados que hemos descrito en varias pruebas (velocidad en laberinto acuático, actividad basal, actividad en el test PM, etc.) del presente “Estudio II”.

Esta diferencia de actividad locomotora se ha observado en este mismo laberinto radial en una cepa de ratas seleccionadas psico-genéticamente por respuestas relacionadas con la ansiedad, en donde también los animales con un perfil conductual más desinhibido presentan una mayor actividad locomotora (Escorihuela *et al.*, 1994b; Fernández-Teruel *et al.*, 2002).

El tratamiento de EP induce una disminución global de la actividad o distancia recorrida en los machos 3xTgAD, llegando incluso a valores similares a los de la actividad mostrada por los ratones controles NTg. Es destacable, que también en el laberinto hexagonal en túnel, la EP “normalice” la hiperactividad en los ratones 3xTgAD, pues supone un resultado similar al que describimos respecto a la velocidad en el laberinto acuático y a la hiperactividad en la prueba de actividad basal circadiana.

5.3.4. Conclusiones del Estudio II

Como resumen de los resultados que presentan los animales 3xTgAD de 4 meses de edad, podemos decir que:

- Los ratones 3xTgAD presentan un déficit de aprendizaje/ memoria espacial ya a los 4 meses de edad (estadios iniciales de la neuropatología -beta-amiloide intraneuronal-) al compararlos con sus respectivos controles NTg.
- Los ratones 3xTgAD manifiestan una mayor inhibición conductual ante la novedad en diferentes test, presentando sistemáticamente niveles superiores de neofobia a los de sus respectivos controles NTg.
- Los machos 3xTgAD presentan conducta desinhibida en pruebas que involucran respuestas de miedo/ansiedad, mientras que las hembras 3xTgAD presentan un perfil más ansioso que los machos.
- Respecto a la actividad espontánea en situación de mínima aversividad, los animales 3xTgAD muestran un comportamiento hiperlocomotor y/o hiperactivo tanto en la prueba de actividad basal circadiana como de la actividad global presentada en el laberinto en túnel.
- A los 4 meses de edad, los machos 3xTgAD presentan un mayor peso corporal que las hembras.

Y respecto al efecto del tratamiento de estimulación postnatal, podemos resumir los siguientes efectos:

- La EP, produce una mejora del aprendizaje espacial en el laberinto de Morris, y disminuye la velocidad de natación, en los ratones 3xTgAD.
- En cambio, y paradójicamente, la EP empeora la ejecución de los ratones 3xTgAD (pero no de los NTg) en cuanto a retención o memoria de la tarea espacial.
- La EP, aumenta la actividad motora y la conducta exploratoria en el test de Campo Abierto.
- La EP, aumenta en general la desinhibición conductual de los ratones 3xTgAD en varias medidas de los test PM, HB y DLB.
- La EP, reduce y normaliza la conducta hiperactiva de los ratones 3xTgAD observada en el test de actividad basal de 24 horas y en el laberinto hexagonal en túnel.

Discusión general

6. DISCUSIÓN GENERAL

¿Cómo se muestran a nivel cognitivo los ratones 3xTgAD a los 4 meses de edad y qué efectos produce la EP?

Los animales 3xTgAD de 4 meses muestran déficits en la capacidad de adquisición de la tarea de aprendizaje espacial de referencia, que se reflejan a través de una mayor trayectoria o distancia recorrida hasta hallar la plataforma, respecto a sus controles. Tales déficits son así mismo extensivos a las sesiones del test de memoria sin plataforma (o “*probe test*”) administrados a las 1:30 horas y a las 24 horas tras la adquisición, y que cuantifican la consolidación/retención de lo aprendido en dicha fase de adquisición. En todas las pruebas realizadas en el MWM encontramos una mayor velocidad de natación por parte de los animales transgénicos respecto a los controles, quizás como un posible reflejo de hiperactividad en estos animales.

El tratamiento de EP revierte los déficits observados en los animales 3xTgAD en la fase de adquisición en el laberinto acuático de Morris, reduciendo de manera significativa tanto la distancia recorrida como la velocidad de natación, y mejorando así la eficiencia del aprendizaje espacial en los ratones transgénicos.

Puede considerarse que nuestros resultados muestran, por primera vez, un déficit cognitivo (espacial) importante, global y en ambos sexos, en ratones 3xTgAD de 4 meses de edad, es decir, a la edad en que se inicia la acumulación de β -amiloide intraneuronal (ver acumulación de β A intraneuronal en ratones 3xTgAD del presente estudio en Figura 6.1; Vivó *et al.*, 2006) y los déficits en LTP dependiente de hipocampo (Billings *et al.*, 2005; García *et al.*, 2011; Oddo *et al.*, 2003a; LaFerla y Oddo, 2005).

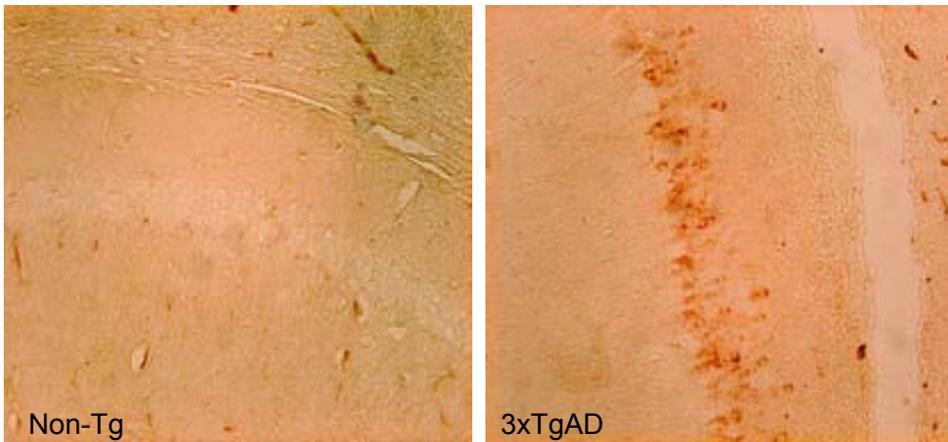


Figura 6.1. Aparición de β A intraneuronal de la capa CA1 del hipocampo de animales machos NTg y 3xTgAD de 4 meses de edad (imagen cedida por M. Vivó).

Decimos que son resultados novedosos porque previamente tanto Billings *et al.* (2005) como recientemente García *et al.* (2011) han mostrado déficits de los ratones 3xTgAD de 4 meses en la tarea espacial del MWM, pero sus resultados se restringen prácticamente a la prueba de memoria sin plataforma realizada 24 horas después de finalizar la fase de adquisición (memoria a largo plazo). Sin embargo no observaron diferencias globales en las curvas de adquisición entre estos animales 3xTgAD y sus controles, así como tampoco observaron diferencias en un ensayo de memoria sin plataforma realizado a las 1:30 horas de la adquisición, ni pudieron establecer efectos del sexo o la generalización de los déficits a ambos sexos. Al margen de lo anterior, cabe recordar que Billings *et al.* (2005; Clinton *et al.*, 2007; García *et al.*, 2011) utilizaron “latencias de escape” como su medida (variable dependiente) de adquisición en la tarea espacial del MWM, asumiendo que no existían diferencias entre genotipos en cuanto a la velocidad de natación, al igual que otros trabajos realizados con este modelo de ratón a diferentes edades (Billings *et al.*, 2007; España *et al.*, 2010; Giménez-Llort *et al.*, 2007; Gulinello *et al.*, 2009; Halagappa *et al.*, 2007; McKee *et al.*, 2008; Pietropaolo *et al.*, 2008a,2009). En cambio trabajos posteriores, incluidos el presente y otros no publicados de nuestro laboratorio (Pietropaolo *et al.*, 2008b; Giménez-Llort *et al.*, 2010; Blázquez, 2011 Tesis doctoral en curso), muestran consistentemente

que los ratones 3xTgAD son significativamente más veloces nadando (en el MWM) que los animales NTg, por lo que la variable dependiente que debe utilizarse para evaluar la adquisición de esta tarea es la “distancia recorrida” hasta hallar la plataforma (en lugar de la “latencia”). Billings *et al.* (2005) hallaron, por otra parte, déficits de memoria en los ratones 3xTgAD de 4 meses en una tarea de evitación pasiva, concluyendo que la función de la amígdala cerebral podría estar afectada ya a esta edad en los animales transgénicos.

En conjunto, la afectación cognitiva hallada por Billings *et al.* (2005; tanto en el MWM como en la evitación pasiva) como por García *et al.* (2011) y en el presente trabajo, es coherente con la conclusión propuesta por dichos autores sobre la existencia de una correlación entre tales déficits y los depósitos de βA a nivel intraneuronal en hipocampo, amígdala y corteza, así como un aumento de la βA_{42} insoluble a esta edad temprana (Billings *et al.*, 2005).

El hecho de que, como ya comentamos en la sección 5.3.1 (“Aprendizaje y memoria espacial en ratones 3xTgAD”), el estrés excesivo y el exceso de glucocorticoides (GCs) perjudiquen la función hipocámpica y cognitiva (Meaney *et al.*, 1985, 1988; Sarrieu *et al.*, 1988), al mismo tiempo que se asocian a un incremento de los signos neuropatológicos de EA en modelos de ratón para esta enfermedad (Dong *et al.*, 2004; Green *et al.*, 2006; Jeong *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2010; Markham *et al.*, 2010; Yao *et al.*, 2007), permite pensar que la reducción de GCs circulantes pueda prevenir o revertir tales efectos neurales/cognitivos negativos. Los efectos beneficiosos de la administración de antidepresivos ISRS sobre la neuropatología de la EA (Finn *et al.*, 2003; Gartside *et al.*, 2003; Gómez F *et al.*, 1998; Jackson *et al.*, 1998; ver también sección 5.3.1) en modelos de ratón transgénico serían consistentes con esta última hipótesis.

Uno de los procedimientos o tratamientos clásicamente utilizados para reducir las respuestas de estrés en ratas y/o ratones es la estimulación postnatal (EP). Así, como ya vimos en secciones de la “Introducción” (apartado 2.4.2.) y en el

punto 5.3.1, y resumiendo, la EP ha mostrado capacidad para: (1) mejorar a largo plazo diversas funciones cognitivas; (2) reducir la ansiedad/miedo y la sensibilidad al estrés; (3) reducir las respuestas hormonales del eje HPA (GCs circulantes, entre otros) y así aumentar la densidad de receptores de GCs en hipocampo (Fernández-Teruel *et al.*, 2002; Levine *et al.*, 1967; Meaney *et al.*, 1988,1989); (4) disminuir la neurodegeneración hipocámpica consecuencia de la cascada neurotóxica “GCs-Glutamato-calcio” (ver discusión en Fernández-Teruel *et al.*, 2002 y Sapolsky *et al.*, 1992) y aumentar la expresión hipocámpica de mRNA-NGF (Mohammed *et al.* 1993; Pham *et al.*, 1997, 1999), y, (5) congruentemente, facilitar la potenciación sináptica a largo plazo -o LTP- (*Long Term Potentiation*; Wilson *et al.*, 1986, Zou *et al.*, 2001). Todo lo anterior hace de la EP un tratamiento con el que (o, a través del que) podemos hipotetizar que podrán afectarse procesos neurales o/y neuroendocrinos de los que intervienen en el desarrollo de los -o, al menos, de algunos de los- aspectos neuropatológicos relacionados con la EA y que se manifiestan en el modelo de ratón 3xTgAD.

Abundando en lo anterior, la reelina, una glicoproteína cuya expresión es mediada por la corticosterona y el estrés, se halla en exceso acumulada (en forma de agregados/placas) en la EA y en el hipocampo de ratones transgénicos para dicha enfermedad, incluidos los 3xTgAD (Knuesel *et al.*, 2009, 2010). Parece que la reducción de la normal expresión neuronal de reelina, así como su acumulación en placas, podría estar en relación con una aceleración de la neuropatología de la EA, incluida la deposición de beta-amiloide y formación de patología de TAU (Knuesel *et al.*, 2009; Kocherhans *et al.*, 2010).

La reelina es crucial en la regulación de los procesos de migración neuronal y posicionamiento en el desarrollo del cerebro (Knuesel *et al.*, 2010; Lussier *et al.*, 2011). Además de este papel en el desarrollo temprano, en cerebro adulto interviene en la modulación de la plasticidad sináptica, mejorando el aprendizaje y el mantenimiento de la LTP (D'Arcangelo *et al.*, 2005; Lussier *et*

al., 2010; Weeber *et al.*, 2002). En línea con tales efectos, se ha observado que el tratamiento con EP en ratones (recordemos que la EP facilita la LTP y el aprendizaje “hipocampo-dependientes”) induce un incremento de la expresión de reelina hipocámpica (Gross *et al.*, 2010). Podemos estar, por tanto, ante un posible y nuevo mecanismo molecular a través del cual la EP produzca sus efectos, que hipotéticamente sería el siguiente:

La regulación al alza de la expresión de reelina hipocámpica, producida por la EP, tendría efectos positivos a nivel de plasticidad neural del hipocampo, así como (y posiblemente relacionado con lo anterior) efectos preventivos sobre la aparición de procesos neuropatológicos de la EA, como son la deposición beta-amiloide y la formación de ovillos de TAU.

Uno de los objetivos fundamentales del presente trabajo era el de evaluar la capacidad de la estimulación postnatal de revertir (o retrasar) los déficits de aprendizaje y memoria, así como de cualquier deterioro o cambio conductual presente en nuestro modelo de ratón 3xTgAD para la EA. Parece plausible pensar que las consecuencias positivas de la EP sobre la función cognitiva, observadas en este trabajo, puedan estar mediadas (entre otros posibles) por sus efectos sobre (1) la actividad del eje HPA (Gcs y sus receptores hipocámpicos), (2) la función de la reelina, (3) la función y plasticidad hipocámpica (implicando probablemente el neurotransmisor glutamato), y (4) el retardo en la acumulación de la β A intraneuronal y en placas extraneuronales.

Completando este esquema hipotético, en la Figura 6.2 hemos intentado representar algunos de los principales mecanismos y efectos conocidos de la EP. La intención es esencialmente describir los aspectos principales o más conocidos influidos por la EP, sin ánimo de llegar a establecer con precisión todas las posibles interacciones biológicas o conductuales-biológicas ni su signo/dirección, puesto que es aún objeto de estudio en la mayor parte de casos tanto el sentido, como el momento ontogenético, como la cantidad e importancia de tales interacciones.

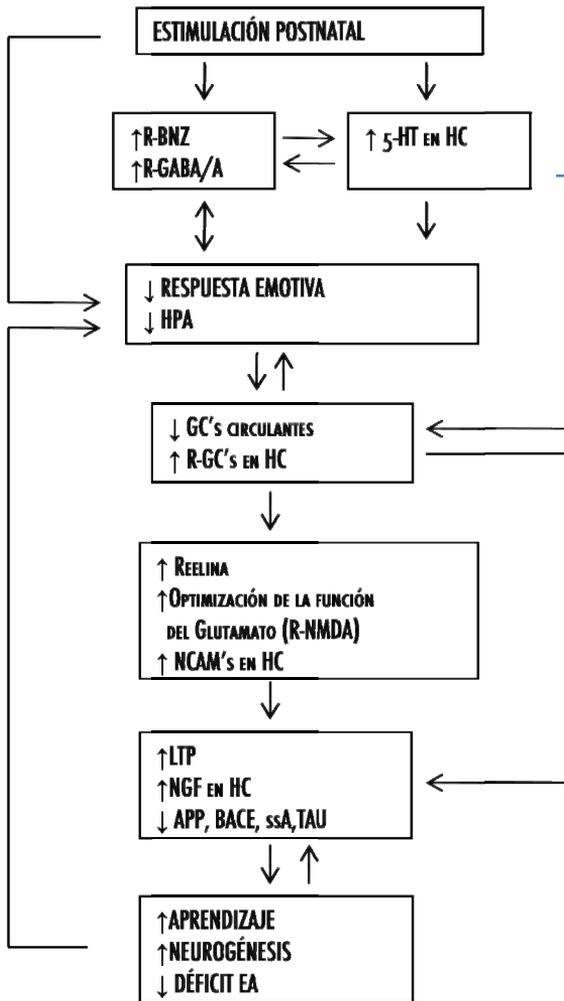


Figura 6.2. Diagrama esquemático de los mecanismos biológicos que podrían intervenir en los efectos de la EP. Modificado de Escorihuela *et al.* (1994b).

En el estadio actual, el presente estudio no permite responder las hipótesis planteadas sobre los mecanismos por los que la EP produjo una mejora cognitiva en los ratones 3xTgAD, pero se espera que estudios ya en curso en nuestro laboratorio puedan empezar a proporcionar respuestas sobre algunos de los mecanismos/efectos biológicos mencionados, así como sobre la capacidad (o no) de la EP de modificar el desarrollo de neuropatología EA en estos ratones.

¿Presentan los ratones 3xTgAD niveles de ansiedad/miedo diferentes de los animales NTg? ¿Cómo afecta la EP a sus respectivos perfiles de respuestas?

Ansiedad y efectos de la Estimulación Postnatal

Si tenemos en cuenta los dos estudios realizados, se constata que los ratones 3xTgAD muestran mayor respuesta de neofobia o inhibición conductual ante la novedad que a los animales controles NTg, como se ha observado en el test de las esquinas (CT o *corner test*; *Estudio I y II*), en la “petrificación” inicial en el test de campo abierto (CA; *Estudio II*) y en los primeros 30 minutos de exposición a una caja nueva en el test de actividad motora basal (*Estudio I*, especialmente). Podríamos decir que, en relación a lo que indica la conducta en dichos test (situaciones de novedad), los ratones 3xTgAD presentan respuestas de miedo/ansiedad elevadas respecto a sus controles, y dichos resultados tienden a ser consistentes con los de otros estudios con este mismo modelo transgénico (Arranz *et al.*, 2009; España *et al.*, 2010; Giménez-Llort *et al.*, 2007, 2008, 2010; Gulinello *et al.*, 2009; Pietropaolo *et al.*, 2008a; Sterniczuk *et al.*, 2010b).

La mayor inhibición conductual de los ratones transgénicos ante la novedad resulta disminuida por la estimulación postnatal en el test de las esquinas (*Estudio II*), y se observa un efecto de la EP de tendencia similar (pero no significativa) sobre la latencia de movimiento inicial en el test de campo abierto (CA; *Estudio II*). Además de estos efectos, la EP produce (i) una mejora cognitiva en la tarea de aprendizaje (en ratones 3xTgAD) y memoria (ratones NTg) espacial, (ii) un incremento global de la conducta exploratoria (cruces y levantamientos –o *rearings*–) en el test de CA, (iii) un aumento de la actividad horizontal (en ratones NTg) en los primeros 30 minutos de exposición a la caja nueva del test de actividad basal, así como (iv) una reducción de la latencia de entrada en brazos abiertos y del número de entradas a cualquier tipo de brazo

en ambos genotipos (NTg y 3xTgAD) en el test del laberinto en cruz elevado. Tales resultados globales (del Estudio II) permiten pensar que el tratamiento de estimulación postnatal (EP) ha sido efectivo, puesto que ha ejercido sobre los animales de ambos grupos experimentales efectos de aparente reducción de las respuestas emotivas (ansiedad, miedo) que subyacen a la inhibición conductual en situaciones de novedad, y que dependen en alguna medida de la actividad locomotora. Otra evidencia clara de la eficacia de la EP usada aquí la constituyen, recordemos, sus efectos positivos sobre la ejecución en las tareas de aprendizaje/memoria espacial discutidas en la sección 6.1 anterior (ver revisiones en Fernández-Teruel *et al.*, 1997, 2002; Gariépy *et al.*, 2002; Macri *et al.*, 2008; Tremml *et al.*, 2002; Zanettini *et al.*, 2010).

No obstante lo dicho, esto es, que los ratones 3xTgAD se caracterizan por mostrar predominantemente inhibición conductual (superior a la de los animales NTg) en los test de novedad mencionados y que la EP tiende a disminuir dicha inhibición conductual, cabe decir que no se observa exactamente lo mismo en el laberinto en cruz elevado, en la caja blanca/negra y en el test de Boissier. Así, en estos tres test se han observado resultados indicativos, por primera vez, de lo que parecería ser una reducción de la ansiedad/miedo en los machos 3xTgAD no tratados de 4 meses de edad, pues dichos animales presentan desinhibición conductual en las tres pruebas mencionadas.

Cabe notar que el grado de inhibición/desinhibición conductual que muestran estos animales 3xTgAD varía dependiendo si se trata de una prueba más o menos aversiva y de las posibilidades de escape (a un lugar más confortable) que ofrece al animal. Así, podemos observar como en las pruebas de campo abierto o similares (p.ej. test de las esquinas, medida de actividad en caja nueva), caracterizadas por ser test abiertos a un espacio con cierto nivel de iluminación y sin posibilidad de escapatoria a otro tipo de espacio, los ratones 3xTgAD muestran sistemáticamente una mayor conducta de inhibición (ver Arranz *et al.*, 2009; García *et al.*, 2011; Giménez-Llort *et al.*, 2007, 2008, 2010;

Gulinello *et al.*, 2008; Nelson *et al.*, 2007; Sterniczuk *et al.*, 2010b, y el presente trabajo). En cambio, en los test como el PM, la DLB y la tabla de agujeros, en los cuales los animales tienen la posibilidad de escoger entre varios espacios con niveles de estimulación marcadamente diferentes, o incluso de esconderse (al menos, la cabeza), la conducta que presentan es contraria a menudo. Esto es, o bien los ratones 3xTgAD no presentan inhibición conductual (respecto a los NTg) o bien presentan incluso conducta desinhibida que puede sugerir un nivel de ansiedad disminuido (Blázquez, 2006; García *et al.*, 2011; Giménez-Llort *et al.*, 2007, 2010; Pietropaolo *et al.*, 2008a, resultados del presente trabajo).

Como dijimos en el apartado de discusión del Estudio II (5.3; ver referencias allí), es muy común que en los trabajos que utilizan ratones transgénicos para alguno de los genes de la EA, incluido el ratón 3xTgAD, estos transgénicos presenten una predominante tendencia a la conducta desinhibida o a la hiperactividad en diferentes situaciones que implican novedad. No obstante, ocurre en muchos casos que, como en el estudio presente, dicha desinhibición no puede interpretarse como una reducción de la ansiedad, puesto que las variables más relevantes (p. ej. porcentajes de entradas o tiempo en brazos abiertos del PM) no se hallan significativamente afectadas (ver referencias en sección 5.3.2).

Otro de los aspectos que entre diferentes estudios puede dar lugar a resultados controvertidos es la “historia experimental” con la que los animales llegan a un determinado test conductual. Un ejemplo de ello es el reciente trabajo de García *et al.* (2011) en el que ratones NTg y 3xTgAD de 4 meses de edad se sometieron a los test de las esquinas, test de CA, de la caja blanca/negra y de la tabla de 4 agujeros. En el test de las esquinas y en el de CA, los resultados fueron consistentes con los del presente trabajo, pues en el primero de ellos se observó inhibición conductual en los ratones 3xTgAD (ambos sexos), mientras que en el CA sólo en hembras 3xTgAD se observó una disminución de la actividad exploratoria y una latencia de movimiento

inicial mayor que en los correspondientes animales NTg (García *et al.*, 2011). En cambio, ni en la caja blanca/negra ni en el test de la tabla de agujeros se observó indicio alguno de desinhibición conductual en los ratones 3xTgAD, a diferencia de lo observado en el presente Estudio II.

Cabe recordar que en el Estudio II nuestros animales se sometieron a los test de CA, laberinto en cruz elevado, caja blanca/negra y tabla de agujeros tras haber pasado por 6 días de entrenamiento en las tareas de aprendizaje en el laberinto acuático de Morris, mientras que en el estudio de García *et al.* (2011) los ratones iniciaron la batería de pruebas conductuales por pruebas sensoriomotoras, seguidas del test de las esquinas, test de CA, test de la caja blanca/negra y test de la tabla de agujeros. Precisamente este aspecto, el orden de las pruebas, o la cantidad de “entrenamiento” (manipulación, etc.) que los animales han recibido antes de un determinado test, podría hallarse en la base de los resultados discrepantes entre diferentes estudios. Nuestros animales (Estudio II) pasaron por experiencias conductuales/ experimentales más extensas y presumiblemente más aversivas (laberinto acuático) que los sujetos del trabajo de García *et al.* (2011), lo que podría eventualmente cambiar su perfil conductual en algunas pruebas en particular (y quizá no en otras). De hecho, en otro trabajo previo, realizado en nuestro laboratorio con ratones de 6 meses de edad, se les sometió a la misma batería de pruebas y en el mismo orden que en el presente estudio II, observándose que los ratones 3xTgAD realizaban más conducta en el compartimento blanco del test de la caja blanca y negra (Giménez-Llort *et al.*, 2007, Blázquez, 2006).

Establecer las causas por las que aparecen tales discrepancias entre estudios, no es fácil, pero la literatura reúne evidencias suficientes de que la historia conductual (o experiencia/entrenamiento previos) y las variables ambientales en general pueden modificar perfiles conductuales considerados típicos o esperables –e incluso predispuestos genéticamente– en determinados animales (Billings *et al.*, 2007; Costa *et al.*, 2007; Crabbe *et al.*, 1999, 2003; McIlwain *et al.*, 2001; Zhu *et al.*, 2009). Incluso se han obtenido resultados

beneficiosos como la mejora de la memoria, de la plasticidad neural, y la disminución de la acumulación de β A, tras simplemente entrenar animales transgénicos en determinadas tareas cognitivas (Billings *et al.*, 2007; Costa *et al.*, 2007; Vicens *et al.*, 1999, 2002; Wolfer *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2010).

La literatura muestra también que se dan diferencias conductuales según el orden en que se produce el test dentro de una batería de pruebas experimentales (McIlwain *et al.*, 2001). Por ese motivo es aconsejable cuando se diseña una batería de pruebas ordenarlas de la menor a mayor aversividad. En un estudio que evaluó los efectos del orden de las pruebas en dos cepas diferentes de ratón, la cepa 129S6 y la cepa C57BL/6J (ambas, base genética de los ratones de nuestro estudio), se encontraron diferencias significativas tanto en la latencia de entrada a la DLB como en el número de transiciones luz-oscuridad, pues ambas conductas fueron significativamente afectadas por el orden de la pruebas/tests en los ratones C57BL/6J (McIlwain *et al.*, 2001).

En definitiva, parecería que los ratones 3xTgAD son más ansiosos (o temerosos) en algunas pruebas, como el CA y el test de las esquinas, pero queda por resolver de forma definitiva si la relativa desinhibición conductual que muestran (respecto a los ratones NTg) en test como el laberinto en cruz elevado o la DLB es debida a su menor ansiedad en esas situaciones o simplemente a un exceso relativo de actividad locomotora (hiperactividad), tal vez debido a su “historia experimental”. Esta hiperactividad ya ha sido descrita previamente en este modelo 3xTgAD (tanto la distancia total en el PM como la actividad locomotora en CA) a la edad de 12m, refiriéndose a un reflejo de hipofuncionalidad hipocampal (Pietropaolo *et al.*, 2008a).

La idea de que las respuestas que hipotéticamente reflejarían ansiedad en la DLB y el laberinto elevado (esto es, latencias de entrada, número de entradas, tiempo en dichos espacios), pueden estar fundamentadas en procesos que difieren entre los ratones NTg y los 3xTgAD, es algo que resulta reforzado por los análisis factoriales realizados con las variables de los diferentes test de

novedad/ansiedad (ver tabla 6.1 y 6.2). Dichos análisis muestran un escenario bastante claro en animales controles NTg (no tratados), con un primer factor de predominio de variables típicas de ansiedad, como el porcentaje de entradas en brazos abiertos (peso de 0.69) y el número de entradas en el compartimento blanco de la DLB (peso de 0.90), y un segundo factor en el que los pesos relevantes son exclusivamente para las variables de actividad total en el CA (0.73), actividad en los brazos cerrados del laberinto elevado (0.78) y la actividad total en el “actímetro” (0.68). Es decir, parecería que en los ratones controles sin tratamiento, su conducta se explica por dos dimensiones diferenciadas, en primer lugar por la ansiedad y en segundo lugar por la actividad locomotora. En cambio, en los animales 3xTgAD no tratados, el panorama factorial es muy diferente, pues aparece un primer factor con todas las variables relacionadas con actividad locomotora y las de ansiedad, salvo el porcentaje de entradas en brazos abiertos del laberinto elevado, que satura sólo en el segundo factor y conjuntamente con la medida de actividad locomotora del mismo test (entradas en brazos cerrados). Es decir, parecería realmente que la conducta de los ratones 3xTgAD en situaciones de novedad (o pruebas típicas de ansiedad incondicionada y dependientes de la actividad) está preferentemente modulada por procesos que, más que con la ansiedad, tienen que ver con la conducta motora (Tabla 6.3 y 6.4).

Dicho de otra manera, en los ratones control (NTg no tratados, ambos sexos) su conducta en la pruebas de novedad/ansiedad se estructura claramente en 2 factores independientes (Tabla 6.2), uno que reúne principalmente las variables/respuestas consideradas típicas de ansiedad y otro que agrupa las respuestas de actividad locomotora. En los ratones transgénicos 3xTgAD (no tratados, ambos sexos), en cambio, su conducta no está tan diferenciada, o está siempre relacionada con la actividad locomotora, como reflejan las saturaciones de variables de ansiedad y de actividad en los dos factores (Tabla 6.4).

Tabla 6.1. Correlación entre las variables en ratones NTg, sin tratamiento y ambos sexos (n=27)

	CA-deam	CA centro	PM-EBC	PM-%EBA	HB-	DLB-	ACT-total
					n	nE	
CA-deam	1						
CA –centro	-0.431**	1					
PM-EBC	0.343*	,117	1				
PM-%EBA	-0.125	0.038	-0.199	1			
HB-n	0.073	-0.006	-0.115	0.274	1		
DLB-nE	0.099	-0.039	0.088	0.488**	0.675***	1	
ACT-total	0.228	0.187	0.421**	-0.042	0.215	0.190	1

Coefficiente de correlación de Pearson, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$. CA-deam; actividad horizontal (n° de cruces) en el test de Campo Abierto (5 min); CA-centro, tiempo de salida del centro del test de Campo abierto ; PM-EBC; número de entradas a los brazos cerrados en el laberinto en cruz elevado; PM%EBA, porcentaje de entradas al brazo abierto del test del laberinto en cruz elevado; HB-n, número total de agujeros explorados (5 min); DLB-nE, número total de entradas en el compratimento iluminado de la caja blanca y negra; ACT-total, Actividad espontanea basal.

Tabla 6.2. Análisis Factorial (rotación OBLIMIN) con normalización Kaiser de diferentes variables en ratones NTg, no tratados y en ambos sexos.

Análisis Factorial (rotación OBLIMIN) en ratones NTg, no tratados y ambos sexos (n=27)

Variables	Factores	
	Factor 1 Ansiedad	F2. Actividad Locomotora
CA-deam	-	0.73
CA –centro	-	-
PM-EBC	-	0.78
PM-%EBA	0.69	-
HB-n	0.83	-
DLB-nE	0.90	-
ACT-total	-	0.68
Varianza acumulada explicada	29.2%	54.0%

Correlación entre factores = 0.01, valores de saturación ≥ 0.35 . Las variables relevantes de cada test conductual se seleccionaron tras análisis factoriales con rotación Varimax (ortogonal), con objeto de escoger las más representativas y menos redundantes de cada una de las pruebas para el definitivo análisis factorial con rotación OBLIMIN (ver Aguilar et.al 2002b; López-Aumatell et.al 2008, 2009).

Tabla 6.3. Correlación entre las variables en ratones 3xTgAD, sin tratamiento y ambos sexos (n=28).

	CA-deam	CA centro	PM-EBC	PM-%EBA	HB-n	DLB-nE	ACT-total
CA-deam	1						
CA -centro	0.335*	1					
PM-EBC	0.521**	-0.225	1				
PM-%EBA	0.063	0.011	-0.265	1			
HB-n	0.439**	-0.506**	0.440**	0.139	1		
DLB-nE	0.582***	-0.417*	0.337*	0.294	0.555***	1	
ACT-total	0.312	-0.049	0.232	0.079	0.156	0.142	1

Coefficiente de correlación de Pearson, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$.

Tabla 6.4 Análisis Factorial (rotación OBLIMIN) con normalización Kaiser de diferentes variables en ratones 3xTgAD, no tratados y en ambos sexos.

Análisis Factorial (rotación OBLIMIN) en ratones 3xTgAD, no tratados y ambos sexos (n=28)

Variables	Factores	
	Factor 1	Factor2
CA-deam	0.80	-
CA -centro	-0.62	-
PM-EBC	0.70	-0.55
PM-%EBA	-	0.91
HB-n	0.80	-
DLB-nE	0.80	-
ACT-total	0.37	-
Varianza acumulada explicada	40.8%	59.0%

Correlación entre factores = 0.019, valores de saturación ≥ 0.35

Actividad locomotora basal y efectos de la EP

Los ratones 3xTgAD presentan una clara tendencia a la conducta hipoactiva (Estudio I) a todas las edades, mostrando una menor actividad motora basal (o espontánea) acumulada durante todo el ciclo circadiano (24 horas) respecto al grupo control NTg (efecto “genotipo”, $p < 0.065$; ver sección 4.2). Esta diferencia es claramente significativa en los primeros 30 minutos de exposición al test durante la fase de luz (efecto “genotipo”, $p = 0.046$; ver sección 4.2), indicativa de una mayor inhibición conductual ante la novedad por parte de los ratones 3xTgAD, así como durante las primeras 5 horas de medida de actividad (en fase de luz; efecto “genotipo”, $p = 0.018$; ver sección 4.2) en todas las edades.

No es plausible por tanto, pensar que a la edad de 4 meses se produce un incremento de la actividad (hiperactividad), visto lo que ocurre a los 2 y 6 meses de edad en el estudio I (ver Fig. 6.3). En cambio, parece más que parsimonioso suponer que el efecto de la historia experimental, es decir, la batería conductual administrada, haya producido cambios en los perfiles conductuales (de actividad espontánea), incrementando la de los ratones 3xTgAD de 4 meses, y disminuyendo la de los ratones control NTg (como puede observarse en la gráfica comparativa de la Figura 6.3).

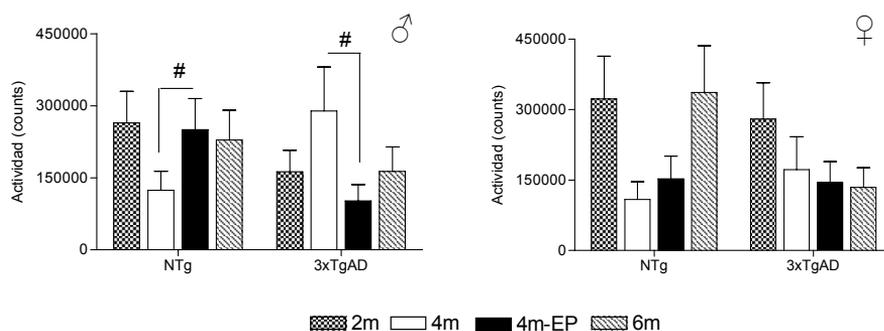


Figura 6.3. Gráfica comparativa de los Estudios I y II. Actividad locomotora basal 24h, en animales de 2 y 6 meses (Estudio I) y de 4 meses (controles y tratados con EP; Estudio II). T de Student; # $p < 0.001$ control vs EP.

Llama considerablemente la atención que la hiperactividad de los ratones 3xTgAD de 4 meses (especialmente los machos) se manifieste también en el test del laberinto en túnel y que, en ambas situaciones, medida de la actividad basal circadiana y laberinto en túnel, la EP tienda a normalizar los valores de los animales transgénicos, como muestran las interacciones “genotipo x tratamiento” en las secciones 5.2.8 (Figura 5.14C-D) y 5.2.9 (Figura 5.15A-D). Aunque el presente trabajo no permite concluir definitivamente sobre ello, las interacciones descritas parecen reforzar la idea de que los ratones 3xTgAD de 4 meses presentan –quizá como consecuencia de la “historia experimental”- índices de actividad locomotora anómalos que tienden a ser contrarrestados (de hecho, prevenidos) por el tratamiento de EP.

En ningún momento nos referimos que las baterías conductuales no se deban utilizar, de hecho, McIlwain *et al.* (2001) sugieren que la batería conductual es la mejor estrategia para obtener la mayor cantidad de información utilizando el menor número de ratones. Eso sí, destacan la necesidad de considerar y controlar el historial previo de los animales experimentales para comprender e interpretar mejor los resultados.

¿Existe algún patrón definido de dimorfismo sexual en este modelo de ratón transgénico?

Aunque las características de la patología principal de la enfermedad de Alzheimer no difieren entre hombres y mujeres, existen evidencias que sugieren que la relación entre la patología y el estado clínico en humanos puede ser específico del género (Barnes *et al.*, 2005). Es conocido que en mujeres existe una mayor susceptibilidad a desarrollar la EA (Fratiglioni *et al.*, 1997; Viña *et al.*, 2010), habiéndose sugerido que los mecanismos subyacentes en las diferencias sexuales pueden estar relacionados con los efectos protectores de la testosterona (Gouras *et al.*, 2000). Incluso se ha observado en humanos que los hombres que están genéticamente

predispuestos a adquirir la EA, presentan niveles bajos de testosterona (Hogervorst *et al.*, 2005).

Se ha observado que ratones machos 3xTgAD gonadectomizados exhiben una disminución de la función hipocampal y a su vez un incremento de la β A en hipocampo y amígdala (Rosario *et al.*, 2006). Por otro lado, en hembras 3xTgAD ovariectomizadas, el tratamiento con estrógenos puede prevenir el incremento de la acumulación de la β A y el déficit de memoria, así como retrasar el inicio de la enfermedad (Caroll *et al.*, 2007). En concordancia con todo esto, también encontramos que los niveles de la enzima (neprilisina) que degrada β A y que es regulada en parte por estrógenos, se hallan significativamente reducidos en hembras 3xTgAD (Iwata *et al.*, 2004). Por este motivo se ha hipotetizado la pérdida de estrógenos en la menopausia puede incrementar la susceptibilidad a la EA en mujeres (Gandy y Duff, 2000).

En el presente trabajo aparecen diferencias sexuales sistemáticas, siendo los machos 3xTgAD los que generalmente presentan una conducta desinhibida o de mayor curiosidad respecto a las hembras. Si agrupamos los resultados, podemos concluir que, respecto a los machos, las hembras 3xTgAD presentan, a grandes rasgos: una mayor conducta de neofobia (*Corner tests*) y mayor respuesta ansiosa (DLB, PM), una menor conducta exploratoria (HB), menor actividad locomotora (PM –entradas en brazos cerrados-, laberinto hexagonal en túnel, medidas de actividad basal -24 h-) y un mayor deterioro del aprendizaje y de la memoria (MWM).

En la historia de este modelo transgénico, encontramos diferencias de género tanto a nivel neuropatológico como del perfil conductual. Se ha hallado dimorfismo sexual tanto en procesos cognitivos como en la respuesta al estrés, siendo las hembras las que presentan una peor ejecución en determinadas tareas de aprendizaje/memoria, mayor ansiedad y mayores niveles de corticosterona plasmática que los machos 3xTgAD (Clinton *et al.*, 2007; García

et al., 2011; Gulinello *et al.*, 2008; Pietropaolo *et al.*, 2008b, 2009; Sterniczuk *et al.*, 2010).

También se han hallado diferencias sexuales a nivel cuantitativo de la βA en hipocampo, que es más elevado en hembras, y se asocia a una patología más agresiva que en los machos 3xTgAD (Hirata-Fukae *et al.*, 2008; Nelson *et al.*, 2007; Pietropaolo *et al.*, 2008b;). De hecho, respecto a los machos, las hembras 3xTgAD muestran un aumento en la producción y una disminución de la degradación de βA , de modo que ambos procesos contribuyen al aumento de la neuropatología (Hirata-Fukae *et al.*, 2008). En concordancia con esta mayor afectación por neuropatología de EA, también existe una mayor reducción de la neurogénesis en las hembras 3xTgAD (Rodríguez *et al.*, 2008). Por todo lo anterior, es razonable hipotetizar que esta mayor afectación en las hembras 3xTgAD, en términos de la neuropatología, es probable que contribuya a los déficits cognitivos observados en el laberinto acuático de Morris.

En otros modelos de EA también aparecen diferencias sexuales en el desarrollo de la patología. Este es el caso de las hembras del modelo Tg2576, en las que se observa un aumento significativo de los niveles de βA_{40} y de la cantidad de placa respecto a los machos (Callahan *et al.*, 2001). Las hembras JNPL3, portadoras del transgén para Tau_{P301L}, también presentan una mayor patología que los machos, y esto parece ser consecuencia de una mayor expresión del transgén (Lewis *et al.*, 2000, 2001). Incluso se han encontrado diferencias sexuales en la cepa control C57BL/6J (utilizada como base genética de los 3xTgAD), en estudios sobre estrategias de orientación espacial (Bettis *et al.*, 2009).

En suma, podemos sugerir que el modelo de ratón 3xTgAD puede ser útil como herramienta para investigar aspectos relativos a las causas de las diferencias de género en la EA y servir en futuros estudios para su prevención y tratamiento.

Aportaciones y limitaciones de este estudio a la investigación de la EA

A pesar de la dificultad de encontrar un buen modelo animal que simule o replique la enfermedad de Alzheimer, podemos considerar que los resultados presentes contribuyen a validar los ratones 3xTgAD como un modelo animal con un buen potencial para estudiar los mecanismos neuronales y neuroendocrinos subyacentes a algunos procesos psicológicos/conductuales alterados y relevantes en la EA, así como para evaluar posibles estrategias terapéuticas o preventivas.

Los resultados también confirman que ciertas alteraciones conductuales que se producen en este modelo 3xTgAD, como por ejemplo la neofobia, aparecen a edades tempranas (antes de que la patología de la β A pueda ser detectada a nivel extracelular), planteando la posibilidad de que quizá algunos síntomas no cognitivos de tipo emocional puedan aparecer en pacientes con Alzheimer durante fases muy iniciales de la enfermedad. Obviamente, estamos realizando una argumentación antropocéntrica, pero está claro que una de las prioridades más urgentes en la investigación sobre la EA es la de identificar precursores, o marcadores de estadios incipientes de la enfermedad para el desarrollo de nuevas terapias dirigidas a las primeras etapas de la misma.

Los resultados obtenidos en aprendizaje/memoria espacial también refuerzan la hipótesis de que la β A intraneuronal sea un marcador primario en el inicio del deterioro cognitivo y que pueda ser relevante en la enfermedad de Alzheimer. Aunque parece claro que para que aparezcan dichos procesos ligados a la BA intraneuronal debe ser necesario que existan otros procesos neurales ya previamente alterados.

A pesar de la implicación de los factores genéticos en la enfermedad, es muy importante considerar los efectos de los factores ambientales, ya que los genes no se expresan de forma aislada respecto al medio ambiente. Existen muchas

evidencias que muestran el impacto del ambiente en la inducción de cambios cerebrales, incluyendo neurogénesis en el hipocampo de adultos y ancianos, en paralelo a cambios en la función cognitiva (Codita *et al.*, 2006). Por otra parte, como hemos revisado en el presente trabajo, experiencias ambientales en sentido amplio, como el estrés de diversos tipos o el exceso de glucocorticoides, agravan o aceleran la neuropatología EA en modelos de ratón.

En cuanto a factores ambientales positivos, la importancia de los factores ambientales (tales como la nutrición, la actividad física y la educación) en mantener la función cognitiva en la vejez, es bien conocida (Mattson, 2004.). Experimentalmente, incluso se ha comprobado que los efectos de dichos factores pueden reducir notablemente tanto los niveles como la deposición de beta-amiloide en cerebros de ratones transgénicos (Billings *et al.*, 2007; Giménez-Llort *et al.*, 2010; Lazarov *et al.*, 2005), al tiempo que inducen mejoras en la función cognitiva (Arendash *et al.*, 2004; Costa *et al.*, 2007; García *et al.*, 2011; Pietropaolo *et al.*, 2008a). Asimismo se ha observado que las experiencias tempranas, tales como el tratamiento de la EP, pueden compensar y mejorar los síntomas cognitivos en ciertos modelos transgénicos de ratón (Tremml *et al.*, 2002).

En la literatura, algunos autores sugieren que la efectividad del tratamiento de estimulación postnatal (EP) puede depender de su acción sobre la disfunción sináptica (Wilson *et al.*, 1986; Zou *et al.*, 2001). Se atribuye a esta, a la disfunción sináptica, el papel de ser un factor muy significativo que contribuye en las etapas iniciales de la pérdida de memoria en la EA (La Ferla y Oddo 2005; Morrissette *et al.*, 2009; Oddo *et al.*, 2004; Querfurth y LaFerla, 2010). Esto convierte a la EP en una forma de intervención con posible capacidad protectora frente a los déficits asociados a la enfermedad de Alzheimer en etapas tempranas, como son, por ejemplo, los que se producen durante el envejecimiento normal, la descompensación hormonal (eje HPA en especial) y de respuestas de estrés, la disminución de la plasticidad sináptica, la neurodegeneración, etc. (Fernández-

Teruel *et al.*, 2002; Gross *et al.*, 2010; Meaney *et al.*, 1988,1989; Wilson *et al.*, 1986; Zou *et al.*, 2001).

Nuestro trabajo ha puesto de manifiesto que la EP puede prevenir (tal vez el efecto es el de retrasar) la aparición de algunos déficits cognitivos y otras alteraciones psicológicas/conductuales en ratones 3xTgAD adultos pero aun jóvenes (4 meses). Presumiblemente, estos déficits o alteraciones deben tener unos mecanismos neuroendocrinos subyacentes, que se ponen en marcha en alguna etapa temprana a lo largo del desarrollo (probablemente bastante previa a la edad de los ratones de este estudio), y tales mecanismos son los que en un futuro deberían estudiarse, en cuanto a su relación con la aparición de la sintomatología EA en estos animales y en cuanto a las posibilidades de modulación a través de experiencias (o tratamientos) ambientales como la EP.

Debemos destacar, no obstante, ciertas limitaciones del presente estudio. Por una parte, como ya habíamos comentado en el planteamiento de la presente tesis (apartado 3.1), un estudio longitudinal, con medidas de SCPD y cognitivas repetidas (en los mismos animales) a diferentes edades, probablemente aportaría datos valiosos, especialmente si se realizase de forma que permitiese su comparación con un estudio transversal.

Por otra parte, la ausencia de parámetros neuroquímicos y neuropatológicos confirmativos en los diferentes grupos experimentales del presente trabajo, limita las posibilidades de interpretación de los resultados y las conclusiones que podemos extraer, puesto que todo ello recae únicamente en parámetros conductuales. Trabajos en curso en nuestro laboratorio y colaboraciones con otros grupos están dirigidos a cubrir estos aspectos neurobiológicos (véase p.ej. García *et al.* 2011; Giménez-Llort *et al.* 2010).

A pesar de que el desarrollo y uso de buenos análogos/modelos animales, de procesos psicológicos humanos, de psicopatologías y neuropatologías (o síntomas o aspectos parciales de las mismas), ha demostrado ser ineludible y

crucial para la comprensión de los mecanismos psico-neurobiológicos subyacentes a los síntomas y trastornos (p. ej. Götz y Ittner 2008; Tobeña y Fernández-Teruel, 2010), en nuestro caso es importante no olvidar que se está intentando “modelar” (o imitar) en ratón toda la complejidad de la EA. Y recordar que ello se hace en base a la manipulación de “sólo” tres genes y utilizando una base genética (“*genetic background*”) muy concreta. De hecho, en el presente trabajo, los ratones 3xTgAD no reproducen, al menos en lo que respecta a ritmos circadianos de actividad, aspectos sensorimotrices y algunas respuestas emocionales (o no cognitivas), el perfil de pacientes con EA.

Lo que principalmente sugiere la presente tesis es la importancia de que futuros estudios se centren en la ontogenia de los procesos neuropatológicos (y síntomas conductuales/cognitivos) en este modelo de ratón o/y en otros similares. El estudio a lo largo del proceso del desarrollo, y los efectos que ejerce el ambiente (o manipulaciones como la EP) sobre los cambios en la regulación genética, sobre la aparición y curso de las sucesivas fases de pre-patología o de neuropatología evidente de EA, son seguramente aproximaciones más heurísticas que los estudios puramente transversales. Deberá también comprobarse si los efectos preventivos de la EP, observados aquí, perduran a lo largo de la vida de los ratones 3xTgAD, y qué modificaciones provocan en aspectos neurobiológicos que puedan asociarse a tales efectos, pero este es un trabajo que ya se está llevando a cabo en nuestro laboratorio.

Conclusiones

7. CONCLUSIONES

I. Respecto a sus controles NTg, los ratones transgénicos 3xTgAD no muestran déficits sensorimotores a ninguna edad, mientras que sí presentan un incremento significativo de peso corporal.

II. Respecto a sus controles, los ratones 3xTgAD son “tímidos”, muestran mayor inhibición conductual (o ansiedad/miedo) en situaciones de novedad que implican espacios abiertos homogéneos (del tipo del Campo Abierto cuadrado o una caja nueva cuadrada).

III. Cuando no han sido aún entrenados en tareas cognitivas, los ratones 3xTgAD muestran actividad basal circadiana disminuida en diferentes edades, efecto que es más marcado en las primeras horas (de luz) de medida de la actividad.

IV. En cambio, tras ser evaluados en varias pruebas (cognitivas y de novedad), los ratones 3xTgAD de 4 meses y con dicha “historia experimental”, presentan cierto “atreimiento” en pruebas típicas de ansiedad, de conducta exploratoria y de actividad basal, siendo este efecto más marcado en los machos.

V. Globalmente, el tratamiento de estimulación postnatal tiende a disminuir conductas indicativas de inhibición conductual o ansiedad en ratones control, como era esperable, y a “normalizar” (reducir) la hiperactividad mencionada en ratones 3xTgAD de 4 meses de edad (con “historia experimental”).

VI. Los ratones 3xTgAD de 4 meses de edad muestran claros déficits de aprendizaje y memoria espacial, además de una incrementada velocidad de natación, indicando por primera vez importantes déficits cognitivos espaciales en ratones jóvenes “triple-transgénicos” en los que ya existe acumulación de beta-amiloide intraneuronal.

VII. El déficit de adquisición de la tarea de aprendizaje espacial, y la excesiva velocidad de natación de los ratones 3xTgAD de 4 meses, son revertidos por el tratamiento de estimulación postnatal. Paradójicamente, el tratamiento no revierte, e incluso empeora en ciertos aspectos, el déficit que los ratones 3xTgAD presentan en las pruebas de retención/memoria espacial.

VIII. En la mayoría de los test de novedad o de ansiedad, aparecen consistentes efectos ligados al sexo, indicativos de que las hembras presentan globalmente menor conducta activa o mayor inhibición conductual.

IX. Por tanto, podemos concluir que, los ratones 3xTgAD de 4 meses de edad muestran un perfil de ciertas funciones cognitivas (espaciales) y de algunos procesos/respuestas emocionales (neofobia), que modelan ciertos síntomas de los estadios iniciales de la Enfermedad de Alzheimer (EA). En este sentido, puede decirse que este modelo de ratón transgénico presenta cierta validez, que lo hace interesante para estudios ulteriores de mayor alcance y profundidad.

X. No cabe decir lo mismo de la validez del ratón 3xTgAD respecto a su capacidad de modelar otros aspectos de la EA, como los procesos sensorimotrices o los ritmos circadianos de actividad motora basal. Respecto a este tipo de procesos no esencialmente cognitivos, y a la luz de los resultados disponibles, todo indica que la validez del modelo queda en entredicho.

Referencias

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ader R (1959) The effects of early experience on subsequent emotionality and resistance to stress. *Psychol Monogr.* **73**:1472.

Ader R (1968) Effects of early experiences on emotional and physiological reactivity in the rat. *J Comp Physiol Psychol.* **66**:264–268.

Adriani W, Ognibene E, Heuland E, Ghirardi O, Caprioli A, Laviola G (2006) Motor impulsivity in APP-SWE mice: a model of Alzheimer's disease. *Behav Pharmacol.* 17(5-6):525-33.

Agniel A, Celsis P, Puel M (1990) Psychiatric disorders in dementia of Alzheimer type: Cognitive and hemodynamic correlates. *Dementia.*1:215-221.

Aguilar R, Escorihuela RM, Gil L, Tobeña A, Fernández-Teruel A (2002a) Differences between two psychogenetically selected lines of rats in a swimming pool matching-to-place task: long-term effects of infantile stimulation. *Behav Genet.* 32(2):127-34.

Aguilar R, Gil L, Flint J, Gray JA, Dawson GR, Driscoll P, Giménez-Llort L, Escorihuela RM, Fernández-Teruel A, Tobeña A (2002b) Learned fear, emotional reactivity and fear of heights: a factor analytic map from a large F(2) intercross of Roman rat strains. *Brain Res Bull.* 57(1):17-26.

Agüera Ortiz L (1998) Demencia. Una aproximación práctica. Barcelona(Ed) Masson.

Aisa B, Tordera R, Lasheras B, Del Río J, Ramírez MJ (2008) Effects of maternal separation on hypothalamic-pituitary-adrenal responses, cognition and vulnerability to stress in adult female rats. *Neuroscience.* 154(4):1218-26.

Aisen PS (2000) Anti-inflammatory therapy for Alzheimer's disease: implications of the prednisone trial. *Acta Neurol Scand Suppl.* 176:85-9.

Allen B, Ingram E, Takao M (2002) Abundant tau filaments and nonapoptotic neurodegeneration in transgenic mice expressing human P301S tau protein. *J Neurosci.* 22:9340–9351.

Ambrée O, Touma C, Görtz N, Keyvani K, Paulus W, Palme R, Sachser N (2006) Activity changes and marked stereotypic behavior precede Abeta pathology in TgCRND8 Alzheimer mice. *Neurobiol Aging.* 27(7):955-64.

Anisman H, Zaharia MD, Meaney MJ, Merali Z (1998) Do early-life events permanently alter behavioral and hormonal responses to stressors?. *Int J Dev Neurosci.* 16(3-4):149-64.

Archer J (1973) Tests for emotionality in rats and mice: a review. *Anim Behav.* 21(2):205-35

Arendash G, Garcia M, Costa D, Cracchiolo J, Wefes I, Potter H (2004) Environmental enrichment improves cognition in aged Alzheimer's transgenic mice despite stable beta-amyloid deposition. *NeuroReport* 15:1751–1754

Arendash GW, King DL, Gordon MN, Morgan D, Hatcher JM, Hope CE, Diamond DM (2001) Age-related behavioral impairments in transgenic mice carrying both mutant amyloid precursor protein and presenilin-1 transgenes. *Brain Res.* 891: 42-53.

Armario A (2006) The hypothalamic-pituitary-adrenal axis: what can it tell us about stressors? *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 5(5):485-501.

Arranz L, Giménez-Llort L, De Castro NM, Baeza I, De la Fuente M (2009) Social isolation during old age worsens cognitive, behavioral and immune impairment. *Rev Esp Geriatr Gerontol.* 44(3):137-42.

Assal F, Cummings JL (2002) Neuropsychiatric symptoms in the dementias. *Curr Opin Neurol* 15:445–50.

Aznar S, Knudsen GM. (2011) Depression and Alzheimer's disease: is stress the initiating factor in a common neuropathological cascade?. *J Alzheimers Dis.* 23(2):177-93.

Bales KR, Verina T, Cummins DJ, Du Y, Dodel RC, Saura J, Fishman CE, DeLong CA, Piccardo P, Petegnief V, Ghetti B, Paul SM (1999) Apolipoprotein E is essential for amyloid deposition in the APP(V717F) transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA.* 96:15233–15238

Bales K, Dodart J, DeMattos RB, Holtzman DM, Paul SM (2002) Apolipoprotein E, amyloid and Alzheimer disease. *Mol Interv.* 2:363–375; 339.

Ballard CG, Gauthier S, Cummings JL, Brodaty H, Grossberg GT, Robert P, Lyketsos CG (2009) Management of agitation and aggression associated with Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol.* 5(5):245-55.

Barbier P, Breteau J, Autret E, Bertrand P, Foussard-Blampin O, Breteau M (1991) Effects of prenatal exposure to diazepam on exploration behavior and learning retention in mice. *Dev Pharmacol Ther.* 17(1-2):35-43.

Barnes LL, Wilson RS, Bienias JL, Schneider JA, Evans DA, Bennett DA (2005) Sex differences in the clinical manifestations of Alzheimer disease pathology. *Arch Gen Psychiatry.* 62(6):685-91.

Bättig K, Driscoll P, Schlatter J, Uster HJ (1976) Effects of nicotine on the exploratory locomotion patterns of female Roman high- and low-avoidance rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 4(4):435-9.

Belzung C, Le Guisquet AM, Crestani F (2000) Flumazenil induces benzodiazepine partial agonist-like effects in BALB/c but not C57BL/6 mice. *Psychopharmacology (Berl)*. 148(1):24-32.

Berger S, Wolfer DP, Selbach O, Alter H, Erdmann G, Reichardt HM, Chepkova AN, Welzl H, Haas HL, Lipp HP, Schütz G (2006) Loss of the limbic mineralocorticoid receptor impairs behavioral plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103(1):195-200.

Bettis TJ, Jacobs LF (2009) Sex-specific strategies in spatial orientation in C57BL/6J mice. *Behav Processes*. 82(3):249-55.

Bhatnagar S, Meaney MJ (1995) Hypothalamic-pituitary-adrenal function in chronic intermittently cold-stressed neonatally handled and non handled rats. *J Neuroendocrinol*. 7(2):97-108.

Billings LM, Green KN, McGaugh JL, LaFerla FM (2007) Learning decreases A beta*56 and tau pathology and ameliorates behavioral decline in 3xTg-AD mice. *J Neurosci*. 27(4):751-61.

Billings LM, Oddo S, Green KN, McGaugh JL, LaFerla FM (2005) Intraneuronal A β causes the onset of early Alzheimer's disease-related cognitive deficits in transgenic mice. *Neuron*. 45:675-88.

Bittner T, Fuhrmann M, Burgold S, Ochs SM, Hoffmann N, Mitteregger G, Kretschmar H, LaFerla FM, Herms J (2010) Multiple events lead to dendritic spine loss in triple transgenic Alzheimer's disease mice. *PLoS One*. 5(11): e15477.

Bizon J, Prescott S, Nicolle MM (2007) Intact spatial learning in adult Tg2576 mice. *Neurobiol Aging*. 28:440-446

Blanchard J, Wanka L, Tung YC, Cárdenas-Aguayo Mdel C, LaFerla FM, Iqbal K, Grundke-Iqbal I (2010) Pharmacologic reversal of neurogenic and neuroplastic abnormalities and cognitive impairments without affecting A β and tau pathologies in 3xTg-AD mice. *Acta Neuropathol.* 120(5):605-21.

Blázquez G (2006) Caracterització conductual del model de ratolí 3xTgAD a estadis inicials de la malaltia d'Alzheimer. Treball de recerca (Tesina), UAB.

Blázquez G (2011) Efectos terapéuticos del enriquecimiento ambiental sobre el perfil cognitivo y emocional en el modelo de ratón 3xTgAD para la enfermedad de Alzheimer. (Tesis), UAB.

Blázquez G, Johansson B, Cañete T, Tobeña A, Oddo S, LaFerla FM, Fernández-Teruel A, Giménez-Llort L (2006) Screening of exploratory behaviour in female 3xTgAD mice. ICREA Brain Research Conference – Advances in Alzheimer's Disease

Blennow K, de Leon MJ, Zetterberg H (2006) Alzheimer's disease. *Lancet.* 368(9533):387-403. Review.

Bodnoff SR, Suranyi-Cadotte B, Quirion R, Meaney MJ (1987) Postnatal handling reduces novelty-induced fear and increases [3H]flunitrazepam binding in rat brain. *Eur J Pharmacol.* 144(1):105-7.

Boekhoorn K, Terwel D, Biemans B, Borghgraef P, Wiegert O, Ramakers GJ, de Vos K, Krugers H, Tomiyama T, Mori H, Joels M, van Leuven F, Lucassen PJ (2006) Improved long-term potentiation and memory in young tau-P301L transgenic mice before onset of hyperphosphorylation and tauopathy. *J Neurosci.* 26(13):3514-23.

Boix F, Fernández Teruel A, Escorihuela RM, Tobeña A (1990) Handling-habituation prevents the effects of diazepam and alprazolam on brain serotonin levels in rats. *Behav Brain Res.* 36(3):209-15.

Borchelt DR, Ratovitski T, van Lare J, Lee MK, Gonzales V, Jenkins NA, Copeland NG, Price DL, Sisodia SS (1997) Accelerated amyloid deposition in the brains of transgenic mice coexpressing mutant presenilin 1 and amyloid precursor proteins. *Neuron*. 19:939–945

Borchelt DR, Thinakaran G, Eckman CB, Lee MK, Davenport F, Ratovitsky T, Prada CM, Kim G, Seekins S, Yager D, Slunt HH, Wang R, Seeger M, Levey AI, Gandy SE, Copeland NG, Jenkins NA, Price DL, Younkin SG, Sisodia SS (1996) Familial Alzheimer's disease-linked presenilin 1 variants elevate Abeta1–42/1–40 ratio in vitro and in vivo. *Neuron*. 17:1005–1013

Borroni B, Costanzi C, Padovani A (2010) Genetic susceptibility to behavioural and psychological symptoms in Alzheimer disease. *Curr Alzheimer Res*. 7(2):158-64.

Bouras C, Hof PR, Giannakopoulos P, Michel JP, Morrison JH (1994). Regional distribution of neurofibrillary tangles and senile plaques in the cerebral cortex of elderly patients: a quantitative evaluation of a one-year autopsy population from a geriatric hospital. *Cereb Cortex*. 4(2):138–50.

Bourin M, Hascoët M (2003) The mouse light/dark box test. *Eur J Pharmacol*. 463(1-3):55-65.

Boyd-Kimball D, Sultana R, Mohmmad-Abdul H, Butterfield DA. (2005) Neurotoxicity and oxidative stress in D1M-substituted Alzheimer's A beta(1-42): relevance to N-terminal methionine chemistry in small model peptides. *Peptides*. 26(4):665-73.

Bozzola FG, Gorelick PhB, Freels S (1992) Personality changes in Alzheimer's disease. *Arch Neurol*. 49:297-300.

Broadhurst PL. (1975) The Maudsley reactive and nonreactive strains of rats: a survey. *Behav Genet.* 5(4):299-319.

Budas G, Coughlan CM, Seckl JR, Breen KC (1999) The effect of corticosteroids on amyloid beta precursor protein/amyloid precursor-like protein expression and processing in vivo. *Neurosci Lett.* 276(1):61-4.

Butterfield DA, Pocernich CB (2003) The glutamatergic system and Alzheimer's disease: therapeutic implications. *CNS drugs.* 17(9):641-52.

Butterfield DA, Poon HF (2005) The senescence-accelerated prone mouse (SAMP8): a model of age-related cognitive decline with relevance to alterations of the gene expression and protein abnormalities in Alzheimer's disease. *Exp Gerontol.* 40(10):774-83.

Cabib S, Puglisi-Allegra S, D'Amato FR (1993) Effects of postnatal stress on dopamine mesolimbic system responses to aversive experiences in adult life. *Brain Res.* 604(1-2):232-9.

Caccamo A, Fisher A, LaFerla FM (2009) M1 agonists as a potential disease-modifying therapy for Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res.* 6(2):112-7. Review.

Caccamo A, Oddo S, Billings LM, Green KN, Martinez-Coria H, Fisher A, LaFerla FM (2006) M1 receptors play a central role in modulating AD-like pathology in transgenic mice. *Neuron.* 49(5):671-82.

Callahan MJ, Lipinski WJ, Bian F, Durham RA, Pack A, Walker LC (2001) Augmented senile plaque load in aged female beta-amyloid precursor protein-transgenic mice. *Am J Pathol.* 158(3):1173-7.

Caraci F, Copani A, Nicoletti F, Drago F (2010) Depression and Alzheimer's disease: neurobiological links and common pharmacological targets. *Eur J Pharmacol.* 626(1):64-71.

Carroll JC, Rosario ER, Chang L, Stanczyk FZ, Oddo S, LaFerla FM, Pike CJ (2007) Progesterone and estrogen regulate Alzheimer-like Neuropathology in female 3xTgAD mice. *Neurobiology of disease* 27(48):13357-13365

Chadman KK, Yang M, Crawley JN (2009) Criteria for validating mouse models of psychiatric diseases. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 150B(1):1-11. Review.

Chaouloff F, Durand M, Mormède P (1997) Anxiety- and activity-related effects of diazepam and chlordiazepoxide in the rat light/dark and dark/light tests. *Behav Brain Res.* 85(1):27-35.

Chartier-Harlin MC, Crawford F, Houlden H, Warren A, Hughes D, Fidani L, Goate A, Rossor M, Roques P, Hardy J, Mullan M (1991) Early-onset Alzheimer's disease caused by mutations at codon 717 of the amyloid precursor protein gene. *Nature.* 353:844–846

Chishti MA, Yang DS, Janus C, Phinney AL, Horne P, Pearson J, Strome R, Zuker N, Loukides J, French J, Turner S, Lozza G, Grilli M, Kunicki S, Morissette C, Paquette J, Gervais F, Bergeron C, Fraser PE, Carlson GA, St George-Hyslop P, Westaway D (2001) Early-onset amyloid deposition and cognitive deficits in transgenic mice expressing a double mutant form of amyloid precursor protein 695. *J Biol Chem.* 276:21562–21570

Cirulli F, Capone F, Bonsignore LT, Aloe L, Alleva E (2007) Early behavioural enrichment in the form of handling renders mouse pups unresponsive to anxiolytic drugs and increases NGF levels in the hippocampus. *Behav Brain Res.*78(2):208-15.

Cleveland DW, Hwo SY, Kirschner MW (1977) Purification of tau, a microtubule-associated protein that induces assembly of microtubules from purified tubulin. *J Mol Biol.* 116:207–225

Clinton LK, Billings LM, Green KN, Caccamo A, Ngo J, Oddo S, McGaugh JL, LaFerla FM (2007) Age-dependent sexual dimorphism in cognition and stress response in the 3xTg-AD mice. *Neurobiol Dis.* 28(1):76-82.

Codita A, Winbland B, Mohammed AH (2006) Of mice and men: more neurobiology in dementia. *Curr Opin Psychiatry.* 19:555-563.

Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses AD, Haines JL y Pericack-Vance MA (1993) Gene dose of apolipoprotein E type allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science.* 261, 921-923.

Corey-Bloom J, (2002) The ABC of Alzheimer's disease: cognitive changes and their management in Alzheimer's disease and related dementias. *Int Psychogeriatr.* 14 Suppl 1:51-75.

Costa DA, Cracchiolo JR, Bachstetter AD, Hughes TF, Bales KR, Paul SM, Mervis RF, Arendash GW, Potter H (2007) Enrichment improves cognition in AD mice by amyloid-related and unrelated mechanisms. *Neurobiol Aging.* 28(6):831-44.

Costall B, Kelly ME, Naylor RJ, Onaivi ES, Tyers MB (1989) Neuroanatomical sites of action of 5-HT₃ receptor agonist and antagonists for alteration of aversive behaviour in the mouse. *Br J Pharmacol.* 96(2):325-32.

Counts SE, Perez SE, Mufson EJ (2008) Galanin in Alzheimer's disease: neuroinhibitory or neuroprotective?. *Cell. Mol. Life. Sci.* 65(12):1842-53. Review.

Coussons-Read ME, Crnic LS (1996) Behavioral assessment of the Ts65Dn mouse, a model for Down syndrome: altered behavior in the elevated plus maze and open field. *Behav Genet.* 26(1):7-13.

Coyle JT, Price DL, DeLong MR (1983) Alzheimer's disease: a disorder of cortical cholinergic innervation. *Science.* 219(4589):1184-90.Review.

Crabbe JC, Wahlsten D (2003) Of mice and their environments. *Science.* 299(5611):1313-4.

Crabbe JC, Wahlsten D, Dudek BC (1999) Genetics of mouse behavior: interactions with laboratory environment. *Science.* 284(5420):1670-2.

Craft TK, Zhang N, Glasper ER, Hurn PD, Devries AC (2006) Neonatal factors influence adult stroke outcome. *Psychoneuroendocrinology.* 31(5):601-13.

Crawley JN (1985) Exploratory behavior models of anxiety in mice. *Neurosci Biobehav Rev.* 9(1):37-44. Review.

Crawley JN, Belknap JK, Collins A, Crabbe JC, Frankel W, Henderson N, Hitzemann RJ, Maxson SC, Miner LL, Silva AJ, Wehner JM, Wynshaw-Boris A, Paylor R (1997) Behavioral phenotypes of inbred mouse strains: implications and recommendations for molecular studies. *Psychopharmacology.*132(2):107-24. Review.

Cruz-Sánchez FF, Gironès X, Ortega A, Alameda F, Lafuente JV. (2010) Oxidative stress in Alzheimer's disease hippocampus: A topographical study. *J Neurol Sci.* 299(1-2):163-7

Cuello AC, Bruno MA, Allard S, Leon W, Iulita MF (2010) Cholinergic involvement in Alzheimer's disease. A link with NGF maturation and degradation. *J Mol Neurosci.* 40(1-2):230-5.

Cummings JL (1997) The Neuropsychiatric Inventory: assessing psychopathology in dementia patients. *Neurology*. 48(5 Suppl 6):S10-6. Review.

Cummings JL (2003) La neuropsiquiatría de la Enfermedad de Alzheimer y demencias relacionadas. Novartis neuroscience (Edición Española)

Daly M (1973) Early stimulation: a critical review of present interpretations. *British Journal of Psychology*, 64, 435-460.

D'Amato FR, Cabib S, Ventura R, Orsini C (1998) Long-term effects of postnatal manipulation on emotionality are prevented by maternal anxiolytic treatment in mice. *Dev Psychobiol*. 32(3):225-34.

D'Arcangelo G (2005) Apoer2: a reelin receptor to remember. *Neuron*. 7(4):471-3.

Daskalakis NP, Kaperoni M, Koros C, de Kloet ER, Kittraki E (2009) Environmental and tactile stimulation modulates the neonatal handling effect on adult rat spatial memory. *Int J Dev Neurosci*. 27(8):747-55.

Dawson GR, Tricklebank MD (1995) Use of the elevated plus maze in the search for novel anxiolytic agents. *Trends Pharmacol Sci*. 16(2):33-6. Review

DeFries JC, Wilson JR, McClearn GE (1970) Open-field behavior in mice: selection response and situational generality. *Behav Genet*. 1(3):195-211.

De Kloet ER, Joëls M, Holsboer F (2005) Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat Rev Neurosci*. 6(6):463-75. Review.

De la Morena-Vicente MA, Barquero MS, Manzano Palomo S (2006) *Revista de neurología*. 42(6) 350

Denenberg VH (1999) Commentary: is maternal stimulation the mediator of the handling effect in infancy?. *Dev Psychobiol.* 34(1):1-3. Review.

Denenberg VH (1969) Open-field behavior in the rat: what does it mean? *Ann N Y Acad Sci.* 159(3):852-9.

Denenberg VH, Morton JRC (1962) Effects of preweaning and postweaning manipulations upon problem-solving behavior, *J Comp Physiol Psychol.* 55: 1996–1998.

Denenberg VH, Rosenberg KM, Paschke R, Zarrow MX (1969) Mice reared with rat aunts: effects on plasma corticosterone and open field activity. *Nature.* 221(5175):73-4.

Denenberg VH, Woodcock JM, Rosenzweig MR (1968) Long-term effects of preweaning and post-weaning free-environment experience on rats problem-solving behavior. *J Comp Physiol Psychol.* 66: 533–535.

Denenberg VH, Garbanati J, Sherman G, Yutzey DA, Kaplan R (1978) Infantile stimulation induces brain lateralization in rats. *Science.* 20:1150–1152.

DeNelsky GY, Denenberg VH (1967) Infantile stimulation and adult exploratory behaviour in the rat: effects of handling upon visual variation-seeking. *Anim Behav.* 15(4):568-73.

D'Hooge R, Nagels G, Westland CE, Mucke L, De Deyn PP (1996) Spatial learning deficit in mice expressing human 751-amino acid beta-amyloid precursor protein. *Neuroreport.* 7(15-17):2807-11.

Ding H, Johnson GV. (2008) The last tangle of tau. *J Alzheimers Dis.* 14(4):441-7.

Dong H, Martin MV, Chambers S, Csernansky JG (2007) Spatial relationship between synapse loss and beta-amyloid deposition in Tg2576 mice. *J Comp Neurol* . 500:311–321

Dong H, Csernansky CA, Martin MV, Bertchume A, Vallera D, Csernansky JG (2005) Acetylcholinesterase inhibitors ameliorate behavioral deficits in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *Psychopharmacology*. 181(1):145-52.

Dong H, Goico B, Martin M, Csernansky CA, Bertchume A, Csernansky JG (2004) Modulation of hippocampal cell proliferation, memory, and amyloid plaque deposition in APPsw (Tg2576) mutant mice by isolation stress. *Neuroscience*. 127:601–609

Dudal S, Krzywkowski P, Paquette J, Morissette C, Lacombe D, Tremblay P, Gervais F (2004) Inflammation occurs early during the Abeta deposition process in TgCRND8 mice. *Neurobiol Aging*. 25(7):861-71.

Duff K, Eckman C, Zehr C (1996) Increased amyloid-beta 42(43) in brains of mice expressing mutant presenilin 1. *Nature*. 383:710–713.

Dumont M, Strazielle C, Staufenbiel M, Lalonde R (2004) Spatial learning and exploration of environmental stimuli in 24-month-old female APP23 transgenic mice with the Swedish mutation. *Brain Res*. 1024(1-2):113-21.

Duyckaerts C, Potier MC, Delatour B (2008) Alzheimer disease models and human neuropathology: similarities and differences. *Acta Neuropathol*. 115(1):5-38. Review.

Eisdorfer C, Cohen D, Paveza GJ (1992) An empirical evaluation of the Global Deterioration Scale for staging Alzheimer's disease. *Am J Psychiatry*. 149:190-194.

Eells JF (1961) Inconsistency of early handling and its effect upon emotionality in the rat, *J Comp Physiol Psychol.* 54:690–693.

Egashira N, Iwasaki K, Ishibashi A, Hayakawa K, Okuno R, Abe M, Uchida N, Mishima K, Takasaki K, Nishimura R, Oishi R, Fujiwara M (2008) Repeated administration of Yokukansan inhibits DOI-induced head-twitch response and decreases expression of 5-hydroxytryptamine (5-HT)_{2A} receptors in the prefrontal cortex. *Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry.* 32:1516–1520.

Eikelenboom P, Veerhuis R, Scheper W, Rozemuller AJ, van Gool WA, Hoozemans JJ (2006) The significance of neuroinflammation in understanding Alzheimer's disease. *J Neural Transm.* 113(11):1685-95.

Elliott EM, Mattson MP, Vanderklis P, Lynch G, Chang I, Sapolsky RM (1993) Corticosterone exacerbates kainate-induced alterations in hippocampal tau immunoreactivity and spectrin proteolysis in vivo. *J Neurochem.* 61(1):57-67.

Engelhart MJ, Ruitenbergh A, Swieten JC, Witteman JCM, Hofman A, Breteler MMB (2000) Dietary anti-oxidants and the risk of dementia. The Rotterdam study. *Neurobiol aging.* 21(suppl 1):S203.

Ericson E, Ahlenius S (1999) Suggestive evidence for inhibitory effects of galanin on mesolimbic dopaminergic neurotransmission. *Brain Res.* 822(1-2):200-9.

Esch FS, Keim PS, Beattie EC, Blacher RW, Culwell AR, Oltersdorf T, McClure D, Ward PJ (1990) Cleavage of amyloid beta peptide during constitutive processing of its precursor. *Science.* 248(4959):1122-4.

Escorihuela RM, Tobeña A, Fernández-Teruel A (1994a) Environmental enrichment reverses the detrimental action of early inconsistent stimulation and increases the beneficial effects of postnatal handling on shuttlebox learning in adult rats. *Behav Brain Res.* 61(2):169-73.

Escorihuela RM, Tobeña A, Fernández-Teruel A (1994b) L'Estimulació infantil. Efectes de l'ambient i l'herència sobre l'emotivitat i l'aprenentatge. Belaterra: Ciència i Tècnica, Medicina. (Ed) Serveis de publicacions de la UAB.

Escorihuela RM, Tobeña A, Fernández-Teruel A (1995b) Environmental enrichment and postnatal handling prevent spatial learning deficits in aged hypoemotional (Roman high-avoidance) and hyperemotional (Roman low-avoidance) rats. *Learn Mem.* 2(1):40-8.

Escorihuela RM, Tobeña A, Driscoll P, Fernández-Teruel A (1995a) Effects of training, early handling, and perinatal flumazenil on shuttle box acquisition in Roman low-avoidance rats: toward overcoming a genetic deficit. *Neurosci Biobehav Rev.* 19(3):353-67.

Escorihuela RM, Fernández-Teruel A, Núñez FJ, Zapata A, Tobeña A (1991) Beneficial effects of infantile stimulation on coping (avoidance) behavior in rats are prevented by perinatal blockade of benzodiazepine receptors with Ro 15-1788. *Neurosci Lett.* 126(1):45-8.

Escorihuela RM, Fernández-Teruel A, Núñez FJ, Zapata A, Tobeña A (1992) Infantile stimulation and the role of the benzodiazepine receptor system in adult acquisition of two-way avoidance behavior. *Psychopharmacology.* 106(2):282-4.

Escorihuela RM, Fernández-Teruel A, Tobeña A, Langhans W, Bättig K, Driscoll P (1997) Labyrinth exploration, emotional reactivity, and conditioned fear in young Roman/Verh inbred rats. *Behav Genet.* 27(6):573-8.

Escorihuela RM, Fernández-Teruel A, Vallina IF, Baamonde C, Lumbreras MA, Dierssen M, Tobeña A, Flórez J (1995c) A behavioral assessment of Ts65Dn mice: a putative Down syndrome model. *Neurosci Lett.* 199(2):143-6.

Escorihuela RM, Vallina IF, Martínez-Cué C, Baamonde C, Dierssen M, Tobeña A, Flórez J, Fernández-Teruel A (1998) Impaired short- and long-term memory in Ts65Dn mice, a model for Down syndrome. *Neurosci Lett.* 247(2-3):171-4.

España J, Giménez-Llort L, Valero J, Miñano A, Rábano A, Rodríguez-Alvarez J, LaFerla FM, Saura CA (2010) Intraneuronal β -Amyloid Accumulation in the Amygdala Enhances Fear and Anxiety in Alzheimer's Disease Transgenic Mice. *Biol. Psychiatry.* 67:513–521

Farr SA, Banks WA, Uezu K, Sano A, Gaskin FS, Morley JE (2003) Antibody to beta-amyloid protein increases acetylcholine in the hippocampus of 12 month SAMP8 male mice. *Life Sci.* 73: 555–562.

Faure A, Verret L, Bozon B, El Tannir El Tayara N, Ly M, Kober F, Dhenain M, Rampon C, Delatour B (2011) Impaired neurogenesis, neuronal loss, and brain functional deficits in the APPxPS1-Ki mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 32(3):407-18.

Fernández J A, Rojo L E, Kuljis R O, Maccioni R B. (2008) The damage signals hipótesis of Alzheimer's disease pathogenesis. *J Alzheimers Dis.* 14: 329-33.

Fernández-Bachiller MI, Pérez C, González-Muñoz GC, Conde S, López MG, Villarroya M, García AG, Rodríguez-Franco MI (2010) Novel tacrine-8-hydroxyquinoline hybrids as multifunctional agents for the treatment of Alzheimer's disease, with neuroprotective, cholinergic, antioxidant, and copper-complexing properties. *J Med Chem.* 53(13):4927-37.

Fernández-Teruel A (2008) *Farmacología de la conducta: de los psicofármacos a las terapias psicológicas.* Bellaterra: Universidad autónoma de Barcelona, Servei de publicacions (Ciencia i Tècnica,37).

Fernández-Teruel A, Escorihuela R.M (2000) Elementos de farmacología conductual: De la investigación básica a la integración con la terapia psicológica. Universidad Autónoma de Barcelona.

Fernández-Teruel A, Escorihuela RM, Jiménez P, Tobeña A (1990) Infantile stimulation and perinatal administration of Ro 15-1788: additive anxiety-reducing effects in rats, *Eur J Pharmacol.* 191:111–114.

Fernández-Teruel A, Escorihuela R.M, Castellano B, González B, Tobeña A (1997) Neonatal handling and environmental enrichment effects on emotionality, novelty/reward seeking, and age-related cognitive and hippocampal impairments: Focus on the Roman rat lines. *Behav. Genet.* 27:513-526. Review.

Fernández-Teruel A, Escorihuela RM, Driscoll P, Tobeña A, Bättig K (1991) Infantile (handling) stimulation and behavior in young Roman high- and low-avoidance rats. *Physiol Behav.* 50(3):563-5.

Fernández-Teruel A, Escorihuela RM, Driscoll P, Tobeña A, Bättig K (1992b) Differential effects of early stimulation and/or perinatal flumazenil treatment in young Roman low- and high-avoidance rats. *Psychopharmacology.* 108(1-2):170-6

Fernández-Teruel A, Escorihuela RM, Driscoll P, Tobeña A, Bättig K (1994) Evaluating activity and emotional reactivity in a hexagonal tunnel maze: correlational and factorial analysis from a study with the Roman/Verh rat lines. *Behav Genet.* 24(5):419-25.

Fernández-Teruel A, Driscoll P, Escorihuela RM, Tobeña A, Bättig K (1993) Postnatal handling, perinatal flumazenil, and adult behavior of the Roman rat lines. *Pharmacol Biochem Behav.* 44(4):783-9.

Fernández-Teruel A, Escorihuela RM, Núñez JF, Gomà M, Driscoll P, Tobeña A (1992a) Early stimulation effects on novelty-induced behavior in two psychogenetically-selected rat lines with divergent emotionality profiles. *Neurosci Lett.* 137(2):185-8.

Fernández-Teruel A, Giménez-Llort L, Escorihuela RM, Gil L, Aguilar R, Steimer T, Tobeña A (2002) Early-life handling stimulation and environmental enrichment: are some of their effects mediated by similar neural mechanisms? *Pharmacol. Biochem. Behav.* 73: 233-45.

Ferré P, Núñez JF, García E, Tobeña A, Escorihuela RM, Fernández-Teruel A (1995) Postnatal handling reduces anxiety as measured by emotionality rating and hyponeophagia tests in female rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 51(2-3):199-203.

Ferré P, Escorihuela RM, Fernández-Teruel A, Núñez JF, García E, González B, Castellano B, Tobeña A (1994) Reducción del impacto del estrés y prevención de los déficits asociados con el envejecimiento en ratas: la estimulación postnatal y el enriquecimiento ambiental. *Anales de Psicología.* 10(2):111-125.

Field T (1986) Interventions for premature infants. *Journal of Pediatrics.* 109:183-191.

Field T, Diego M, Hernandez-Reif M (2010) Preterm infant massage therapy research: a review. *Infant Behav Dev.* 33(2):115-24. Review.

File SE, Wardill AG (1975) Validity of head-dipping as a measure of exploration in a modified hole-board. *Psychopharmacologia.* 44(1):53-9.

Finkel SI (2003) Behavioral and psychological symptoms of dementia. *Clin. Geriatr. Med.* 19(4):799-824. Review.

Finn DP, Martí O, Harbuz MS, Vallès A, Belda X, Márquez C, Jessop DS, Lalies MD, Armario A, Nutt DJ, Hudson AL (2003) Behavioral, neuroendocrine and neurochemical effects of the imidazoline I2 receptor selective ligand BU224 in naive rats and rats exposed to the stress of the forced swim test. *Psychopharmacology*. 167(2):195-202.

Fisher A (2008) Cholinergic treatments with emphasis on m1 muscarinic agonists as potential disease-modifying agents for Alzheimer's disease. *Neurotherapeutics*. 5(3):433-42. Review.

Fitzgerald RE, Berres M, Schaeppi U (1988) Validation of a radial maze test for assessing learning and memory in rats. *Toxicology*. 49(2-3):425-32.

Fonseca MI, Ager RR, Chu SH, Yazan O, Sanderson SD, LaFerla FM, Taylor SM, Woodruff TM, Tenner AJ (2009) Treatment with a C5aR antagonist decreases pathology and enhances behavioral performance in murine models of Alzheimer's disease. *J Immunol*. 183(2):1375-83.

Forti P, Pisacane N, Rietti E, Lucicesare A, Olivelli V, Mariani E, Mecocci P, Ravaglia G (2010) Metabolic syndrome and risk of dementia in older adults. *J Am Geriatr Soc*. 58(3):487-92.

Francis DD, Champagne FA, Liu D, Meaney MJ (1999) Maternal care, gene expression, and the development of individual differences in stress reactivity. *Ann N Y Acad Sci*. 896:66-84. Review.

Frankle WG, Lombardo I, New AS, Goodman M, Talbot PS, Huang Y, Hwang DR, Slifstein M, Curry S, Abi-Dargham A, Laruelle M, Siever LJ. (2005) Brain serotonin transporter distribution in subjects with impulsive aggressivity: a positron emission study with [11C]McN 5652. *Am J Psychiatry*. 162(5):915-23.

Fratiglioni L, Viitanen M, von Strauss E, Tontodonati V, Herlitz A, Winblad B (1997) Very old women at highest risk of dementia and Alzheimer's disease: incidence data from the Kungsholmen Project, Stockholm. *Neurology*. 48(1):132-8.

Friedland RP (1993) Epidemiology, education, and the ecology of Alzheimer's disease. *Neurology*. 43(2):246-9.

Games D, Adams D, Alessandrini R, Barbour R, Berthelette P, Blackwell C, Carr T, Clemens J, Donaldson T, Gillepsie F, Guido T, Hagopian S, Johnson-Wood K, Khan K, Lee M, Leibowitz P, Liberburg I, Little S, Masliah E, McColongue L, Montaya-Zavala M, Mucke L, Paganini L, Penniman E, Power M, Schenk D, Seubert P, Snyder B, Soriano F, Tan H, Vitale J, Wadsworth S, Wolozin B, Zhao J (1995) Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F -amyloid precursor protein. *Nature* 373:523–527

Ganea K, Lielbl C, Stermann V, Müller M.B, Schmidt M.V (2007) Pharmacological validation of a novel home cage activity counter in mice. *Journal of Neuroscience methods*. 162: 180-186.

Gandy S, Duff K (2000) Post-menopausal estrogen deprivation and Alzheimer's disease. *Exp Gerontol*. 35(4):503-11. Review.

Galani R, duconseille E, Bildstein O, Cassel JC (2001) Effects of room and cage familiarity on locomotor activity measures in rats. *Physiol behav*. 74:1-4.

García Y, López-Ramos JC, Giménez-Llort L, Revilla S, Guerra R, Gruart A, Laferla FM, Cristòfol R, Delgado-García JM, Sanfeliu C (2011) Physical Exercise Protects Against Alzheimer's Disease in 3xTg-AD Mice. *J Alzheimers Dis*. 23:1-34.

Gariépy JL, Rodriguiz RM, Jones BC (2002) Handling, genetic and housing effects on the mouse stress system, dopamine function, and behavior. *Pharmacol Biochem Behav.* 73(1):7-17.

Gartside SE, Leitch MM, Young AH (2003) Altered glucocorticoid rhythm attenuates the ability of a chronic SSRI to elevate forebrain 5-HT: implications for the treatment of depression. *Neuropsychopharmacology.* 28(9):1572-8.

Gerlai R (1996) Gene-targeting studies of mammalian behavior: is it the mutation or the background genotype? *Trends Neurosci.* 19(7):271.

Giménez-Llort L, Arranz L, Maté I, De la Fuente M (2008) Gender-specific neuroimmunoendocrine aging in a triple-transgenic 3xTg-AD mouse model for Alzheimer's disease and its relation with longevity. *Neuroimmunomodulation.* 15(4-6):331-43. Review.

Giménez-Llort L, Fernández-Teruel A, Escorihuela RM, Fredholm BB, Tobeña A, Pekny M, Johansson B (2002) Mice lacking the adenosine A1 receptor are anxious and aggressive, but are normal learners with reduced muscle strength and survival rate. *Eur. J. Neurosci.* 16, 547-50.

Giménez-Llort L, García Y, Buccieri K, Revilla S, Suñol C, Cristofol R, Sanfeliu C (2010) Gender-Specific Neuroimmunoendocrine Response to Treadmill Exercise in 3xTg-AD Mice. *Int J Alzheimers Dis.* 2010:128354.

Giménez-Llort L, Masino SA, Diao L, Fernández-Teruel A, Tobeña A, Halldner L, Fredholm BB (2005) Mice lacking the adenosine A1 receptor have normal spatial learning and plasticity in the CA1 region of the hippocampus, but they habituate more slowly. *Synapse.* 57(1):8-16.

Giménez-Llort L, Blázquez G, Cañete T, Johansson B, Oddo S, Tobeña A, LaFerla FM, Fernández-Teruel A (2007) Modeling behavioral and neuronal symptoms of Alzheimer's disease in mice: a role for intraneuronal amyloid. *Neurosci Biobehav Rev.* 31(1):125-47

Giménez-Llort L, Blázquez G, Cañete T, Rosa R, Vivo M, Oddo S, Navarro X, LaFerla FM, Johansson B, Tobeña A, Fernández-Teruel A (2006) Modeling neuropsychiatric symptoms of Alzheimer's disease dementia in 3xTg-AD mice. In: Iqbal K, Winblad B, Avila J, editors. *Alzheimer's Disease: New Advances*. Englewood, NJ, USA: Medimond; 2006. pp. 513–516.

Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L, GiuVra L, Haynes A, Irving N, James L, Mant R, Newton P, Rooke K, Roques P, Talbot C, Pericak-Vance M, Roses A, Williamson R, Rossor M, Owen M, Hardy J (1991) Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature*. 349:704–706

Goldgaber D. (2006) My story: the discovery and mapping to chromosome 21 of the Alzheimer amyloid gene. *J Alzheimers Dis*. 9(3 Suppl):349-60.

Goldgaber D, Lerman MI, McBride WO, Saffiotti U, Gajdusek DC (1987) Isolation, characterization, and chromosomal localization of human brain cDNA clones coding for the precursor of the amyloid of brain in Alzheimer's disease, Down's syndrome and aging. *J Neural Transm Suppl*. 24:23-8.

Gómez F, Graugés P, Martín M, Armario A (1998) The effect of chronic administration of antidepressants on the circadian pattern of corticosterone in the rat. *Psychopharmacology*. 140(2):127-34.

González B, Castellano B, Vela J, Fábregas P, Dalmau I, Escorihuela RM, Tobeña A, Fernández-Teruel A (1994) Enrichment and early handling protect against age-related deficits. A behavioral and histological study in RHA/Verh and RLA/Verh rats. Instituto Juan March de Estudios e Investigaciones: "*Deterioration, stability and regeneration of the brain during normal aging*". Madrid: (Ed) Peninsular, Serie Universitaria.

Götz J, Ittner LM (2008) Animals models of Alzheimer's disease and frontotemporal dementia. *Nature Review* 9:532–544.

Götz J, Ittner LM, Kins S (2006) Do axonal defects in tau and amyloid precursor protein transgenic animals model axonopathy in Alzheimer's disease. *J Neurochem.* 98:993–1006.

Götz J, Chen F, Barmettler R, Nitsch R (2001a) Tau filament formation in transgenic mice expressing P301L tau. *J Biol Chem.* 276:529–534.

Götz J, Chen F, van Dorpe J, Nitsch RM (2001b) Formation of neurofibrillary tangles in P301L tau transgenic mice induced by Abeta42 fibrils. *Science.* 293:1491–1495

Gouras GK, Tsai J, Naslund J, Vincent B, Edgar M, Checler F, Greenfield JP, Haroutunian V, Buxbaum JD, Xu H, Greengard P, Relkin NR (2000) Intraneuronal Abeta42 accumulation in human brain. *Am. J. Pathol.* 156: 15-20.

Graves L, Pack A, Abel T (2001) Sleep and memory: a molecular perspective. *Trends Neurosci.* 24(4):237-43.

Gray JA (1979) Emotionality in male and female rodents: a reply to Archer. *Br J Psychol.* 70(3):425-40.

Green KN, LaFerla FM, (2008) Linking calcium to Abeta and Alzheimer's disease. *Neuron.* 59(2):190-4.

Green KN, Billings LM, Roozendaal B, McGaugh JL, LaFerla FM (2006) Glucocorticoids increase amyloid-beta and tau pathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 26(35):9047-56.

Green KN, Martinez-Coria G, Khashwji H, Hall EB, Yurko-Mauro KA, Ellis L, LaFerla FM, (2007) Dietary docosahexaenoic acid and docosapentaenoic acid ameliorate amyloid-beta and tau pathology via a mechanism involving presenilin 1 levels. *The Journal of Neuroscience.* 27:4385-4395.

Greenwood CE, Tam C, Chan M, Young KW, Binns MA, van Reekum R (2005) Behavioral disturbances, not cognitive deterioration, are associated with altered food selection in seniors with Alzheimer's disease. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 60(4):499-505.

Griebel G, Belzung C, Perrault G, Sanger DJ (2000) Differences in anxiety-related behaviours and in sensitivity to diazepam in inbred and outbred strains of mice. *Psychopharmacology.* 148(2):164-70.

Groër MW, Hill J, Wilkinson JE, Stuart A (2002) Effects of separation and separation with supplemental stroking in BALb/c infant mice. *Biol Res Nurs.* 3(3):119-31.

Gross CM, Flubacher A, Tinnes S, Heyer A, Scheller M, Herpfer I, Berger M, Frotscher M, Lieb K, Haas CA (2010) Early life stress stimulates hippocampal reelin gene expression in a sex-specific manner: Evidence for corticosterone-mediated action. *Hippocampus.* [Epub ahead of print]

Gsell W, Jungkunz G, Riederer P (2004) Functional neurochemistry of Alzheimer's disease. *Curr Pharm Des.* 10(3):265-93. Review.

Gulinello M, Gertner M, Mendoza G, Schoenfeld BP, Oddo S, LaFerla F, Choi CH, McBride SM, Faber DS (2009) Validation of a 2-day water maze protocol in mice. *Behav Brain Res.* 196(2):220-7.

Gyure KA, Durham R, Stewart WF, Smialek JE, Troncoso JC (2001) Intraneuronal abeta-amyloid precedes development of amyloid plaques in Down syndrome. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 125:489-92.

Halagappa VK, Guo Z, Pearson M, Matsuoka Y, Cutler RG, Laferla FM, Mattson MP (2007) Intermittent fasting and caloric restriction ameliorate age-related behavioral deficits in the triple-transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis.* 26(1):212-20.

Handley SL, McBlane JW, Critchley MA, Njung'e K (1993) Multiple serotonin mechanisms in animal models of anxiety: environmental, emotional and cognitive factors. *Behav Brain Res.* 58(1-2):203-10. Review.

Hanisch U K, Kettenmann H (2007). Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci.* 10 (11): 1387-94.

Hardy J, Allsop D (1991) Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol Sci.* 12(10):383-388

Hardy JA, Higgins GA (1992) Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science.* 256(5054):184-5.

Harper DG, Stopa EG, McKee AC, Satlin A, Fish D, Volicer L (2004) Dementia severity and Lewy bodies affect circadian rhythms in Alzheimer disease. *Neurobiol Aging.* 25(6):771-81.

Hasegawa T, Mikoda N, Kitazawa M, LaFerla FM (2010) treatment of Alzheimer disease with anti-homocysteic acid antibody in 3xTgAD mice. *PLoS One.* 5(1):e8593.

Hebb DO (1947) the effects of early experience on problem-solving at maturity. *American Psychologist.* 2:306-307.

Heneka MT, Rodríguez JJ, Verkhratsky A (2010) Neuroglia in neurodegeneration. *Brain Res Rev* 63(1-2):189-211.

Heneka MT, Sastre M, Dumitrescu-Ozimek L, Dewachter I, Walter J, Klockgether T, Van Leuven F (2005) Focal glial activation coincides with increased BACE1 activation and precedes amyloid plaque deposition in APP[V717I] transgenic mice. *J Neuroinflamm.* 2:22

Hernández F, Avila J (2007) Tauopathies. *Cell. Mol. Life Sci.* 64 (17): 2219–33.

Higgins GA, Jacobsen H (2003) Transgenic mouse models of Alzheimer's disease: phenotype and application. *Behav Pharmacol.* 14:419–438.

Hillen H, Barghorn S, Striebinger A, Labkovsky B, Müller R, Nimmrich V, Nolte MW, Perez-Cruz C, van der Auwera I, van Leuven F, van Gaalen M, Beshpalov AY, Schoemaker H, Sullivan JP, Ebert U. (2010) Generation and therapeutic efficacy of highly oligomer-specific beta-amyloid antibodies. *J Neurosci.* 30(31):10369-79.

Hirata-Fukae C, Li HF, Hoe HS, Gray AJ, Minami SS, Hamada K, Niikura T, Hua F, Tsukagoshi-Nagai H, Horikoshi-Sakuraba Y, Mughal M, Rebeck GW, LaFerla FM, Mattson MP, Iwata N, Saido TC, Klein WL, Duff KE, Aisen PS, Matsuoka Y (2008) Females exhibit more extensive amyloid, but not tau, pathology in an Alzheimer transgenic model. *Brain Res.* 1216:92-103.

Hogervorst E, Bandelow S, Moffat SD (2005) Increasing testosterone levels and effects on cognitive functions in elderly men and women: a review. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord.* 4(5):531-40. Review.

Hökfelt T, Xu ZQ, Shi TJ, Holmberg K, Zhang X (1998) Galanin in ascending systems. Focus on coexistence with 5-hydroxytryptamine and noradrenaline. *Ann N Y Acad Sci.* 863:252-63. Review.

Holmes A, le Guisquet AM, Vogel E, Millstein RA, Leman S, Belzung C (2005) Early life genetic, epigenetic and environmental factors shaping emotionality in rodents. *Neurosci Biobehav Rev.* 29(8):1335-46. Review.

Holmes C, Boche D, Wilkinson D, et al (2008) Long-term effects of Abeta42 immunisation in Alzheimer's disease: follow-up of a randomised, placebo-controlled phase I trial. *Lancet.* 372 (9634): 216–23.

Holtzman DM, Bales KR, Tenkovai T, Fagan AM, Parsadanian M, Sartorius LJ, Mackey B, Olney J, McKeel D, Wozniaki D, Paul S (2000) Apolipoprotein E isoform-dependent amyloid deposition and neuritic degeneration in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA*. 97:2892–2897

Holtzman DM, Santucci D, Kilbridge J, Chua-Couzens J, Fontana DJ, Daniels SE, Johnson RM, Chen K, Sun Y, Carlson E, Alleva E, Epstein CJ, Mobley WC (1996) Developmental abnormalities and age-related neurodegeneration in a mouse model of Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93(23):13333-8.

Houeland G, Romani A, Marchetti C, Amato G, Capsoni S, Cattaneo A, Marie H (2010) Transgenic mice with chronic NGF deprivation and Alzheimer's disease-like pathology display hippocampal region-specific impairments in short- and long-term plasticities. *The Journal neuroscience*. 30(39):13089-13094.

Hsiao K, Chapman P, Nilsen S, Eckman C, Harigaya Y, YounKin S, Yang F, Cole G (1996) Correlative memory deficits, Abeta elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science*. 274:99–102

Hsiung GYR, Sadovnick AD, Feldman (2004) Apolipoprotein E ϵ 4 genotype as a risk factor for cognitive decline and dementia: data from the Canadian Study of Health and Aging. *CMAJ*. 171(8): 863–867.

Huitron-Resendiz S, Sanchez-Alavez M, Gallegos R, Berg G, Crawford E, Giacchino JL, Games D, Henriksen SJ, Criado JR (2002) Age-independent and age-related deficits in visuospatial learning, sleep-wake states, thermoregulation and motor activity in PDAPP mice. *Brain Res*. 928:126–137

Hutton M, Hardy J (1997) The presenilins and Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet*. 6(10): 1639-1646.

Imanaka A, Morinobu S, Toki S, Yamamoto S, Matsuki A, Kozuru T, Yamawaki S (2008) Neonatal tactile stimulation reverses the effect of neonatal isolation on open-field and anxiety-like behavior, and pain sensitivity in male and female adult Sprague-Dawley rats. *Behav Brain Res.* 186(1):91-7.

Irizarry MC, McNamara M, Fedorchak K, Hsiao K, Hyman BT (1997a) APPSw transgenic mice develop age-related A beta deposits and neuropil abnormalities, but no neuronal loss in CA1. *J Neuropathol Exp Neurol.* 56:965-973

Irizarry MC, Soriano F, McNamara M, Page KJ, Schenk D, Games D, Hyman BT (1997b) Abeta deposition is associated with neuropil changes, but not with overt neuronal loss in the human amyloid precursor protein V717F (PDAPP) transgenic mouse. *J Neurosci.* 17:7053-7059

Isaacs AM, Senn DB, Yuan M, Shine JP, Yankner BA (2006) Acceleration of amyloid beta-peptide aggregation by physiological concentrations of calcium. *J Biol Chem.* 281(38):27916-23.

Iwasaki K, Satoh-Nakagawa T, Maruyama M, Monma Y, Nemoto M, Tomita N, Tanji H, Fujiwara H, Seki T, Fujii M, Arai H, Sasaki H (2005) A randomized, observer-blind, controlled trial of the traditional Chinese medicine Yi-Gan San for improvement of behavioral and psychological symptoms and activities of daily living in dementia patients. *J Clin Psychiatry.* 66(2):248-52.

Iwata N, Mizukami H, Shirotani K, Takaki Y, Muramatsu S, Lu B, Gerard NP, Gerard C, Ozawa K, Saido TC (2004) Presynaptic localization of neprilysin contributes to efficient clearance of amyloid-beta peptide in mouse brain. *J Neurosci.* 24(4):991-8.

Jackson IM, Luo LG (1998) Antidepressants inhibit the glucocorticoid stimulation of thyrotropin releasing hormone expression in cultured hypothalamic neurons. *J Investig Med.* 46(9):470-4.

Jacobsen JS, Wu CC, Redwine JM, Comery TA, Arias R, Bowlby M, Martone R, Morrison JH, Pangalos MN, Reinhart PH, Bloom FE (2006) Early-onset behavioral and synaptic deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103(13):5161-6.

Janus C, Westaway D (2001) Transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *Physiol. Behav.* 73: 873-886.

Jensen MT, Mottin MD, Cracchiolo JR, Leighty RE, Arendash GW (2005) Lifelong immunization with human beta-amyloid (1-42) protects Alzheimer's transgenic mice against cognitive impairment throughout aging. *Neuroscience*.130(3):667-84.

Jeste DV, Wragg RE, Salmon DP (1992) Cognitive deficits of patients with Alzheimer's disease with and without delusions. *Am J Psychiatry*.149:184-189.

Jeong YH, Park CH, Yoo J, Shin KY, Ahn SM, Kim HS, Lee SH, Emson PC, Suh YH (2006) Chronic stress accelerates learning and memory impairments and increases amyloid deposition in APPV7171-CT100 transgenic mice, an Alzheimer's disease model. *FASEB J*. 20(6):729-31.

Johansson B, Halldner L, Dunwiddie TV, Masino SA, Poelchen W, Giménez-Llort L, Escorihuela RM, Fernández-Teruel A, Wiesenfeld-Hallin Z, Xu XJ, Hårdemark A, Betsholtz C, Herlenius E, Fredholm BB (2001) Hyperalgesia, anxiety, and decreased hypoxic neuroprotection in mice lacking the adenosine A1 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98(16):9407-12.

Katzman R, (1986) Alzheimer's Disease. *New England Journal of Medicine* 314: 964-973.

Kawasumi M, Chiba T, Yamada M, Miyamae-Kaneko M, Matsuoka M, Nakahara J, Tomita T, Iwatsubo T, Kato S, Aiso S, Nishimoto I, Kouyama K (2004) Targeted introduction of V642I mutation in amyloid precursor protein gene causes functional abnormality resembling early stage of Alzheimer's disease in aged mice. *Eur J Neurosci.* 19(10):2826-38.

Kell DB (2010) Towards a unifying, systems biology understanding of large-scale cellular death and destruction caused by poorly liganded iron: Parkinson's, Huntington's, Alzheimer's, prions, bactericides, chemical toxicology and others as examples. *Arch Toxicol.* 84(11):825-89. Review.

King DL, Arendash GW (2002) Behavioral characterization of the Tg2576 transgenic model of Alzheimer's disease through 19 months. *Physiol Behav* 75:627-642

King DL, Arendash GW, Crawford F, Sterk T, Menendez J, Mullan MJ (1999) Progressive and gender-dependent cognitive impairment in the APP(SW) transgenic mouse model for Alzheimer's disease. *Behav Brain Res.* 103(2):145-62.

Kinney GA, Emmerson PJ, Miller RJ (1998) Galanin receptor-mediated inhibition of glutamate release in the arcuate nucleus of the hypothalamus. *J Neurosci.* 18(10):3489-500.

Kitazawa M, Oddo S, Yamasaki TR, Green KN, LaFerla FM (2005) Lipopolysaccharide-induced inflammation exacerbates tau pathology by a cyclin-dependent kinase 5-mediated pathway in a transgenic model of Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 25:8843-53.

Kitazawa M, Vasilevko V, Cribbs DH, LaFerla FM. Immunization with amyloid-beta attenuates inclusion body myositis-like myopathology and motor impairment in a transgenic mouse model. *J Neurosci.* 29(19):6132-41.

Knuesel I (2010) Reelin-mediated signaling in neuropsychiatric and neurodegenerative diseases. *Prog Neurobiol.* 91(4):257-74. Review.

Knuesel I, Nyffeler M, Mormède C, Muhia M, Meyer U, Pietropaolo S, Yee BK, Pryce CR, LaFerla FM, Marighetto A, Feldon J (2009) Age-related accumulation of Reelin in amyloid-like deposits. *Neurobiol Aging.* 30(5):697-716.

Kocherhans S, Madhusudan A, Doehner J, Breu KS, Nitsch RM, Fritschy JM, Knuesel I (2010) Reduced Reelin expression accelerates amyloid-beta plaque formation and tau pathology in transgenic Alzheimer's disease mice. *J Neurosci.* 30(27):9228-40.

Kopp C (2001) Locomotor activity rhythm in inbred strains of mice: implications for behavioural studies. *Behav Brain Res.* 125(1-2):93-6.

Kounnas MZ, Danks AM, Cheng S, Tyree C, Ackerman E, Zhang X, Ahn K, Nguyen P, Comer D, Mao L, Yu C, Pleynet D, Digregorio PJ, Velicelebi G, Stauderman KA, Comer WT, Mobley WC, Li YM, Sisodia SS, Tanzi RE, Wagner SL (2010) Modulation of gamma-secretase reduces beta-amyloid deposition in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neuron.* 67(5):769-80.

Kramer LI, Pierpont ME (1976) Rocking waterbeds and auditory stimulation to enhance growth of preterm infants. *Journal of Pediatrics.* 88:297-299.

Kuhn CM, Schanberg SM, Field T, Symanski R, Zimmerman E, Scafidi F, Roberts J (1991) Tactile-kinesthetic stimulation effects on sympathetic and adrenocortical function in preterm infants. *J Pediatr.* 119(3):434-40.

Kuo YM, Emmerling MR, Bisgaier CL, Essenburg AD, Lampert HC, Drumm D, Roher AE (1998) Elevated low-density lipoprotein in Alzheimer's disease correlates with brain abeta 1-42 levels. *Biochem Biophys Res Commun.* 27;252(3):711-5.

LaFerla FM (2010) Pathways linking Abeta and tau pathologies. *Biochem Soc Trans.* 38(4):993-5. Review.

LaFerla FM, Oddo S (2005) Alzheimer's disease: Abeta, tau and synaptic dysfunction. *Trends Mol Med.* 11(4):170-6. Review.

LaFerla FM, Green KN, Oddo S (2007) Intracellular amyloid beta in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci.* 8:499-509

Lalonde R, Strazielle C (2009) Exploratory activity and motor coordination in old versus middle-aged C57BL/6J mice. *Arch Gerontol Geriatr.* 49(1):39-42.

Lalonde R, Kim HD, Fukuchi K (2004) Exploratory activity, anxiety, and motor coordination in bigenic APP^{swe} + PS1/DeltaE9 mice. *Neurosci Lett.* 369(2):156-61.

Lalonde R, Qian S, Strazielle C (2003b) Transgenic mice expressing the PS1-A246E mutation: effects on spatial learning, exploration, anxiety, and motor coordination. *Behav Brain Res.* 138:71-79

Lalonde R, Dumont M, Staufenbiel M, Sturchler-Pierrat C, Strazielle C (2002) Spatial learning, exploration, anxiety, and motor coordination in female APP23 transgenic mice with the Swedish mutation. *Brain Res.* 956:36-44

Lalonde R, Lewis TL, Strazielle C, Kim H, Fukuchi K (2003a) Transgenic mice expressing the betaAPP695SWE mutation: effects on exploratory activity, anxiety, and motor coordination. *Brain Res.* 977:38-45

Lanari A, Amenta F, Silvestrelli G, Tomassoni D, Parnetti L (2006) Neurotransmitter deficits in behavioural and psychological symptoms of Alzheimer's disease. *Mech Ageing Dev.* 127(2):158-65.

Lazarov O, MorWni GA, Pigino G, Gadadhar A, Chen X, Robinson J, Ho H, Brady ST, Sisodia SS (2007) Impairments in fast axonal transport and motor neuron deWcits in transgenic mice expressing familial Alzheimer's disease-linked mutant presenilin 1. *J Neurosci* 27:7011–7020

Lazarov O, Robinson J, Tang YP, Hairston IS, Korade-Mirnic Z, Lee VM, Hersh LB, Sapolsky RM, Mirnic K, Sisodia SS (2005) Environmental enrichment reduces Abeta levels and amyloid deposition in transgenic mice. *Cell*. 120(5):701-13.

Lee, KW, Lee SH, Kim H, Song JS, Yang SD, Paik SG, Han PL (2004) Progressive cognitive impairment and anxiety induction in the absence of plaque deposition in C57BL/6 inbred mice expressing transgenic amyloid precursor protein. *J. Neurosci. Res.* 76:572-80.

Lemaire V, Lamarque S, Le Moal M, Piazza PV, Abrous DN (2006) Postnatal stimulation of the pups counteracts prenatal stress-induced deficits in hippocampal neurogenesis. *Biol Psychiatry*. 59(9):786-92.

Levine S (1956) A further study of infantile handling and adult avoidance learning. *Journal of personality*. 25:70-80.

Levine S (1957) Infantile experience and resistance to physiological stress. *Science*. 126(3270):405.

Levine S (1958) Noxious stimulation in infant and adult rats and consummatory behavior. *J Comp Physiol Psychol*. 51(2):230-3.

Levine S (1962) Plasma free corticosteroid response to electric shock in rats stimulated in infancy. *Science*. 135:795-796.

Levine S (2000) Influence of psychological variables on the activity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Eur J Pharmacol*. 405(1-3):149-60. Review.

Levine S, Broadhurst PL (1963) Genetic and ontogenetic determinants of adult behavior in the rat, *J Comp Physiol Psychol.* 56:423–428.

Levine S, Alpert M, Lewis GW (1957) Infantile experience and the maturation of the pituitary adrenal axis. *Science.* 126:1347.

Levine S, Chevalier JA, Korchin SJ (1956) The effects of early shock and handling on later avoidance conditioning. *Journal of personality.* 24:475-493.

Levine S, Haltmeyer GC, Karas GG, Denenberg VH (1967) Physiological and behavioral effects of infantile stimulation. *Physiology and Behavior* 2:55-59.

Lewis J, Dickson DW, Lin WL, Chisholm L, Corral A, Jones G, Yen SH, Sahara N, Skipper L, Yager D, Eckman C, Hardy J, Hutton M, McGowan E (2001) Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP. *Science.* 293:1487–1491

Lewis J, McGowan E, Rockwood J, Melrose H, Nacharaju P, Van Slegtenhorst M, Gwinn-Hardy K, Paul Murphy M, Baker M, Yu X, DuV K, Hardy J, Corral A, Lin WL, Yen SH, Dickson DW, Davies P, Hutton M (2000) Neurofibrillary tangles, amyotrophy and progressive motor disturbance in mice expressing mutant (P301L) tau protein. *Nat Genet.* 25:402–405

Li WZ, Li WP, Yao YY, Zhang W, Yin YY, Wu GC, Gong HL (2010) Glucocorticoids increase impairments in learning and memory due to elevated amyloid precursor protein expression and neuronal apoptosis in 12-month old mice. *Eur J Pharmacol.* 628(1-3):108-15.

Lopez OL, Lopez-Pousa S, Kamboh MI, Adroer R, Oliva R, Lozano-Gallego M, Becker JT, DeKosky ST (1998) Apolipoprotein E polymorphism in Alzheimer's disease: a comparative study of two research populations from Spain and the United States. *Eur Neurol.* 39(4):229-33.

López-Aumatell R, Guitart-Masip M, Vicens-Costa E, Gimenez-Llort L, Valdar W, Johannesson M, Flint J, Tobeña A, Fernandez-Teruel A (2008) Fearfulness in a large N/Nih genetically heterogeneous rat stock: differential profiles of timidity and defensive flight in males and females. *Behav Brain Res.* 188(1):41-55.

López-Aumatell R, Vicens-Costa E, Guitart-Masip M, Martínez-Membrives E, Valdar W, Johannesson M, Cañete T, Blázquez G, Driscoll P, Flint J, Tobeña A, Fernández-Teruel A (2009) Unlearned anxiety predicts learned fear: a comparison among heterogeneous rats and the Roman rat strains. *Behav Brain Res.* 202(1):92-101.

Lussier AL, Romay-Tallón R, Kalynchuk LE, Caruncho HJ (2011) Reelin as a putative vulnerability factor for depression: Examining the depressogenic effects of repeated corticosterone in heterozygous reeler mice. *Neuropharmacology.* 60(7-8):1064-74.

Macrí S, Chiarotti F, Würbel H (2008) Maternal separation and maternal care act independently on the development of HPA responses in male rats. *Behav Brain Res.* 191(2):227-34.

Macrí S, Pasquali P, Bonsignore LT, Pieretti S, Cirulli F, Chiarotti F, Laviola G (2007) Moderate neonatal stress decreases within-group variation in behavioral, immune and HPA responses in adult mice. *PLoS One.* 2(10):e1015.

Manuel I, Cañete T, LaFerla FM, Gimenez-Llort L, Rodríguez-Puertas R (2007) Relation between the anxiety-like behavior and the activity of muscarinic, cannabinoid and galanin receptors at limbic areas in the early stages of the 3xTgAD mice model of Alzheimer's disease. Abstract en *XII congreso de la sociedad Española de Neurociencia – SENC- Valencia.*

Markesbery WR, Ehmann WD (1999) Oxidative stress in Alzheimer disease. *Alzheimer disease, (2º ed).* Philadelphia: Lippincott, 401-414

Markham JA, Taylor AR, Taylor SB, Bell DB, Koenig JI (2010) Characterization of the cognitive impairments induced by prenatal exposure to stress in the rat. *Front Behav Neurosci.* 4:173.

Martí O, Armario A (1998) Anterior pituitary response to stress: time-related changes and adaptation. *Int J Dev Neurosci.* 16(3-4):241-60.

Martín Carrasco M, Agüera Ortiz M, Pelegrin Valero C, Moriñigo Dominguez A (2002) Las demencias. *Psiquiatria Geriatrica.* Barcelona: (Ed) Masson.

Martín Carrasco M, Loizaga Arnaiz C, Moreno Flores P, Vázquez Rivera S (2004) La enfermedad de Alzheimer. Un trastorno neuropsiquiátrico. Barcelona: (Ed) Masson.

Martinez-Coria H, Green KN, Billings LM, Kitazawa M, Albrecht M, Rammes G, Parsons CG, Gupta S, Banerjee P, LaFerla FM (2010) Memantine improves cognition and reduces Alzheimer's-like neuropathology in transgenic mice. *Am J Pathol.* 176(2):870-80.

Martínez-Cué C, Baamonde C, Lumbreras M, Paz J, Davisson MT, Schmidt C, Dierssen M, Flórez J (2002) Differential effects of environmental enrichment on behavior and learning of male and female Ts65Dn mice, a model for Down syndrome. *Behav Brain Res.* 134(1-2):185-200.

Martinez Lage JM, Khachaturian ZS (2001) Alzheimer XXI: ciencia y sociedad. Barcelona, (Ed) Masson S.A

Martys-Zage JL, Kim SH, Berechid B, Bingham SJ, Chu S, Sklar J, Nye J, Sisodia SS. (2000) Requirement for presenilin-1 in facilitating lagged 2-mediated endoproteolysis and signaling of notch 1. *J Mol Neurosci.* 15(3):189-204.

Masters CL, Simms G, Weinman NA, Multhaup G, McDonald BL, Beyreuther K (1985) Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:4245–4249

Mastrangelo MA, Bowers WJ (2008) Detailed immunohistochemical characterization of temporal and spatial progression of Alzheimer's disease-related pathologies in male triple-transgenic mice. *BMC Neurosci.* 9:81.

Mattson MP (2004) Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature* (review) 430:631–639.

Mcllwain KL, Merriweather MY, Yuva-Paylor LA, Paylor R (2001) The use of behavioral test batteries: effects of training history. *Physiol Behav.* 73(5):705-17.

McKee AC, Carreras I, Hossain L, Ryu H, Klein WL, Oddo S, LaFerla FM, Jenkins BG (2008) Ibuprofen reduces A β , hyperphosphorylated tau and memory deficits in Alzheimer mice. *Brain Research.* 1207: 225-236

Meaney MJ (2001) Maternal care, gene expression, and the transmission of individual differences in stress reactivity across generations. *Annu Rev Neurosci.* 24:1161-92. Review.

Meaney MJ, Aitken DH, Sapolsky R (1987) Thyroid hormones influence the development of hippocampal glucocorticoid receptors in the rat: A mechanism for the effects of postnatal handling on the development of the adrenocortical stress response. *Neuroendocrinology*, 45, 278-283.

Meaney MJ, Aitken DH, Berkel C, Bhatnagar S, Sapolsky R (1988) Effects of neonatal handling on age-related impairments associated with the hippocampus. *Science.* 239: 766-768.

Meaney MJ, Aitken DH, Viau V, Sharma S, Sarrieau A (1989) Neonatal handling alters adrenocortical negative feedback sensitivity and hippocampal type II glucocorticoid receptor binding in the rat. *Neuroendocrinology*. 50:597-604.

Meaney MJ, Aitken DH, Bodnoff SR, Iny LJ, Tatarewicz JE, Sapolsky RM (1985) Early postnatal handling alters glucocorticoid receptor concentrations in selected brain regions. *Behav Neurosci*. 99(4):765-70.

Meaney MJ, Mitchell JB, Aitken DH, Bhatnagar S, Bodnoff SR, Iny LJ, Sarrieau A (1991) The effects of neonatal handling on the development of the adrenocortical response to stress: implications for neuropathology and cognitive deficits in later life. *Psychoneuroendocrinology*. 1991;16(1-3):85-103.

Meaney MJ, Diorio J, Francis D, Widdowson J, LaPlante P, Caldji C, Sharma S, Seckl JR, Plotsky PM (1996) Early environmental regulation of forebrain glucocorticoid receptor gene expression: implications for adrenocortical responses to stress. *Dev Neurosci*. 18(1-2):49-72. Review.

Medeiros R, Baglietto-Vargas D, Laferla FM (2010) The Role of Tau in Alzheimer's Disease and Related Disorders. *CNS Neurosci Ther*. [Epub ahead of print]

Meerlo P, Horvath KM, Nagy GM, Bohus B, Koolhaas JM (1999) The influence of postnatal handling on adult neuroendocrine and behavioural stress reactivity. *J Neuroendocrinol*. 11(12):925-33.

Meyer-Luehmann M, Stalder M, Herzig MC, Kaeser SA, Kohler E, Pfeifer M, Boncristiano S, Mathews PM, Mercken M, Abramowski D, Staufenbiel M, Jucker M (2003) Extracellular amyloid formation and associated pathology in neural grafts. *Nat Neurosci* 6(4):370-7.

Millan MJ, Veiga S, Girardon S, Brocco M (2003) Blockade of serotonin 5-HT_{1B} and 5-HT_{2A} receptors suppresses the induction of locomotor activity by 5-HT reuptake inhibitors, citalopram and fluvoxamine, in NMRI mice exposed to a novel environment: a comparison to other 5-HT receptor subtypes. *Psychopharmacology* 168(4):397-409.

Millstein RA, Holmes A (2007) Effects of repeated maternal separation on anxiety- and depression-related phenotypes in different mouse strains. *Neurosci Biobehav Rev.* 31(1):3-17. Review.

Mishima K, Tozawa T, Satoh K, Matsumoto Y, Hishikawa Y, Okawa M. (1999) Melatonin secretion rhythm disorders in patients with senile dementia of Alzheimer's type with disturbed sleep-waking. *Biol Psychiatry.* 45(4):417-21.

Mitchell JB, Iny LJ, Meaney MJ (1990) The role of serotonin in the development and environmental regulation of type II corticosteroid receptor binding in rat hippocampus. *Brain Res Dev Brain Res.* 55(2):231-5.

Mitchell JB, Betito K, Rowe W, Boksa P, Meaney MJ (1992) Serotonergic regulation of type II corticosteroid receptor binding in hippocampal cell cultures: evidence for the importance of serotonin-induced changes in cAMP levels. *Neuroscience.* 48(3):631-9.

Mitsukawa K, Lu X, Bartfai T (2008) Galanin, galanin receptors and drug targets. *Cell Mol Life Sci.* 65(12):1796-805. Review.

Mohammed AH, Henriksson BG, Söderström S, Ebendal T, Olsson T, Seckl JR (1993) Environmental influences on the central nervous system and their implications for the aging rat. *Behav Brain Res.* 57(2):183-91. Review.

Moles A, Rizzi R, D'Amato FR (2004) Postnatal stress in mice: does "stressing" the mother have the same effect as "stressing" the pups? *Dev Psychobiol.* 44(4):230-7

Moran PM, Higgins LS, Cordell B, Moser PC (1995) Age-related learning deficits in transgenic mice expressing the 751-amino acid isoform of human β -amiloide precursor protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92:5341-5345.

Mori C, Spooner ET, Wisniewsk KE, Wisniewski TM, Yamaguch H, Saido TC, Tolan DR, Selkoe DJ, Lemere CA (2002) Intraneuronal Abeta42 accumulation in Down syndrome brain. *Amyloid.* 9:88-102.

Morris R (1984) Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods.* 11(1):47-60.

Morris RGM (1981) Spatial localization does not require the presence of local cues. *Learn Motiv.* 12:239–260.

Morris RGM, Anderson E, Lynch GS, Baudry M (1986) Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature* 319:774 –776.

Morrisette DA, Parachikova A, Green KN, LaFerla FM (2009) Relevance of transgenic mouse models to human Alzheimer disease. *J Biol Chem.* 284 (10):6033-7. Review.

Mudher A, Lovestone S (2002). Alzheimer's disease-do tauists and baptists finally shake hands?. *Trends Neurosci.* 25(1): 22–26.

Need AC, Giese KP (2003) Handling and environmental enrichment do not rescue learning and memory impairments in alphaCamKII(T286A) mutant mice. *Genes Brain Behav.* 2(3):132-9.

Nelson RL, Guo Z, Halagappa VM, Pearson M, Gray AJ, Matsuoka Y, Brown M, Martin B, Iyun T, Maudsley S, Clark RF, Mattson MP. (2007) Prophylactic treatment with paroxetine ameliorates behavioral deficits and retards the development of amyloid and tau pathologies in 3xTgAD mice. *Exp Neurol.* 205(1):166-76.

Nomura Y, Okuma Y. (1999) Age-related defects in lifespan and learning ability in SAMP8 mice. *Neurobiol Aging*. 20(2):111-5.

Núñez JF, Ferré P, García E, Escorihuela RM, Fernández-Teruel A, Tobeña A (1995) Postnatal handling reduces emotionality ratings and accelerates two-way active avoidance in female rats. *Physiol Behav*. 57(5):831-5.

Núñez JF, Ferré P, Escorihuela RM, Tobeña A, Fernández-Teruel A (1996) Effects of postnatal handling of rats on emotional, HPA-axis, and prolactin reactivity to novelty and conflict. *Physiol Behav*. 60(5):1355-9.

Oddo S, LaFerla FM (2006c) The role of nicotinic acetylcholine receptors in Alzheimer's disease. *Journal of Physiology*. 99(2-3):172–179

Oddo S, Caccamo A, Tran L (2006a) Temporal profile of amyloid beta (Abeta) oligomerization in an in vivo model of Alzheimer disease. A link between Abeta and tau pathology. *J Biol Chem*. 281:1599–1604.

Oddo S, Caccamo A, Cheng D, LaFerla FM (2009) Genetically altering Abeta distribution from the brain to the vasculature ameliorates tau pathology. *Brain Pathol*. 19(3):421-30.

Oddo S, Billings L, Kesslak JP, Cribbs DH, LaFerla FM (2004) Abeta immunotherapy leads to clearance of early, but not late hyperphosphorylated tau aggregates via proteasome. *Neuron*. 43(3):321–332.

Oddo S, Caccamo A, Kitazawa M, Tseng BP, LaFerla FM (2003b) Amyloid deposition precedes tangle formation in a triple transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging*. 24:1063-70.

Oddo S, Caccamo A, Smith IF, Green KN, LaFerla FM (2006b) A dynamic relationship between intracellular and extracellular pools of Abeta. *Am J Pathol*. 168:184–194

Oddo S, Caccamo A, Cheng D, Jouleh B, Torp R, LaFerla FM (2007) Genetically augmenting tau levels does not modulate the onset or progression of Abeta pathology in transgenic mice. *J Neurochem* 102:1053–1063

Oddo S, Caccamo A, Green KN, Liang K, Tran L, Chen Y, Leslie FM, LaFerla FM, (2005) Chronic nicotine administration exacerbates tau pathology in transgenic model of Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102:3046-51.

Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kaye R, Metherate R, Mattson MP, Akbari Y, LaFerla FM (2003a) Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular A β and synaptic dysfunction. *Neuron*. 39:409-21.

Oettinger R, Martin JR, Rosenberg E, Bättig K (1985) Effects of tunnel maze complexity on caffeinic hyperactivity in the rat. *Pharmacol Biochem Behav.* 23(1):85-90.

Ognibene E, Middei S, Daniele S, Adriani W, Ghirardi O, Caprioli A, Laviola G (2005) Aspects of spatial memory and behavioral disinhibition in Tg2576 transgenic mice as a model of Alzheimer's disease. *Behav Brain Res.* 156:225–232

Ögren SO, Kuteeva E, Elvander-Tottie E, Hökfelt T (2010) Neuropeptides in learning and memory processes with focus on galanin. *Eur J Pharmacol.* 626(1):9-17. Review.

Okawa M, Mishima K, Hishikawa Y, Hozumi S, Hori H, Takahashi K (1991) Circadian rhythm disorders in sleep-waking and body temperature in elderly patients with dementia and their treatment. *Sleep.* 14(6):478-85.

Okuma Y, Nomura Y (1998) Senescence-accelerated mouse (SAM) as an animal model of senile dementia: pharmacological, neurochemical and molecular biological approach. *Jpn J Pharmacol.* 78(4):399-404.

Onen F, Onen SH (2003) Sleep rhythm disturbances in Alzheimer's disease. *Rev Med Interne*. 24:165–71.

Ownby RL, Crocco E, Acevedo A, John V, Loewenstein D (2006) Depression and risk for Alzheimer disease: systematic review, meta-analysis, and metaregression analysis. *Arch Gen Psychiatry*. 63(5):530-8.

Oyama F, Sawamura N, Kobayashi K, Morishima-Kawashima M, Kuramochi T, Ito M, Tomita T, Maruyama K, Saido TC, Iwatsubo T, Capell A, Walter J, Grunberg J, Ueyama Y, Haass C, Ihara Y (1998) Mutant presenilin 2 transgenic mouse: effect on an age-dependent increase of amyloid beta-protein 42 in the brain. *J Neurochem*. 71:313–322

Parfitt DB, Walton JR, Corriveau EA, Helmreich DL (2007) Early life stress effects on adult stress-induced corticosterone secretion and anxiety-like behavior in the C57BL/6 mouse are not as robust as initially thought. *Horm Behav*. 52(4):417-26.

Pedersen W, Culmsee C, Ziegler D, Herman J, Mattson M (1999) Aberrant stress response associated with severe hypoglycemia in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Mol Neurosci*. 13:159–65.

Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M (1985). Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J. Neurosci. Methods* 14: 149-67.

Pellow S, File SE (1986) Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: A novel test of anxiety in the rat. *Pharmacol Biochem Behav*. 24:525-529.

Pennanen L, Wolfer DP, Nitsch RM, Götz J (2006) Impaired spatial reference memory and increased exploratory behavior in P301L tau transgenic mice. *Genes Brain Behav*. 5(5):369-79.

Perez SE, He B, Muhammad N, Oh KJ, Fahnestock M, Ikonovic MD, Mufson EJ (2011) Cholinergic basal forebrain system alterations in 3xTgAD transgenic mice. *Neurobiol. Dis.* 41(2):338-52

Peskind ER, Wilkinson CW, Petrie EC, Schellenberg GD, Raskind MA (2001) Increased CSF cortisol in AD is a function of APOE genotype. *Neurology.* 56(8):1094-8.

Pham TM, Söderström S, Henriksson BG, Mohammed AH (1997) Effects of neonatal stimulation on later cognitive function and hippocampal nerve growth factor. *Behav Brain Res.* 86(1):113-20.

Pham TM, Söderström S, Winblad B, Mohammed AH (1999) Effects of environmental enrichment on cognitive function and hippocampal NGF in the non-handled rats. *Behav Brain Res.* 103(1):63-70.

Pham K, Nacher J, Hof PR, McEwen BS (2003) Repeated restraint stress suppresses neurogenesis and induces biphasic PSA-NCAM expression in the adult rat dentate gyrus. *Eur J Neurosci.* 17(4):879-86

Phillis JW. (2005) Acetylcholine release from the central nervous system: a 50-year retrospective. *Crit Rev Neurobiol.* 17(3-4):161-217. Review.

Pietropaolo S, Feldon J, Yee BK (2008a) Age-dependent phenotypic characteristics of a triple transgenic mouse model of Alzheimer disease. *Behav Neurosci.* 122(4):733-47.

Pietropaolo S, Sun Y, Li R, Brana C, Feldon J, Yee BK (2008b) The impact of voluntary exercise on mental health in rodents: a neuroplasticity perspective. *Behav Brain Res.* 192(1):42-60.

Pietropaolo S, Sun Y, Li R, Brana C, Feldon J, Yee BK (2009) Limited impact of social isolation on Alzheimer-like symptoms in a triple transgenic mouse model. *Behav Neurosci.* 123(1):181-95.

Potter PE (2010) Investigational medications for treatment of patients with Alzheimer disease. *J Am Osteopath Assoc.* 110(9 Suppl 8):S27-36.

Priller C, Bauer T, Mitteregger G, Krebs B, Kretschmar HA, Herms J (2006) Synapse formation and function is modulated by the amyloid precursor protein. *J Neurosci.* 26 (27):7212–21.

Pryce CR, Feldon J (2003) Long-term neurobehavioural impact of the postnatal environment in rats: manipulations, effects and mediating mechanisms. *Neurosci Biobehav Rev.* 27(1-2):57-71. Review.

Pryce CR, Rüedi-Bettschen D, Dettling AC, Weston A, Russig H, Ferger B, Feldon J (2005) Long-term effects of early-life environmental manipulations in rodents and primates: Potential animal models in depression research. *Neurosci Biobehav Rev.* 29(4-5):649-74. Review.

Pugh PL, Ahmed SF, Smith MI, Upton N, Hunter AJ (2004) A behavioural characterisation of the FVB/N mouse strain. *Behav Brain Res.* 155(2):283-9.

Pugh PL, Richardson JC, Bate ST, Upton N, Sunter D (2007) Non-cognitive behaviours in an APP/PS1 transgenic model of Alzheimer's disease. *Behav Brain Res.* 178(1):18-28.

Qian S, Jiang P, Guan X (1998) Mutant human presenilin 1 protects presenilin null mouse against embryonic lethality and elevates Abeta 1–42/43 expression. *Neuron* 20:611–617.

Querfurth HW, LaFerla FM (2010) Alzheimer's disease. *N Engl J Med.* 362(4):329-44.

Reeves RH, Irving NG, Moran TH, Wohn A, Kitt C, Sisodia SS, Schmidt C, Bronson RT, Davisson MT (1995) A mouse model for Down syndrome exhibits learning and behaviour deficits. *Nat Genet* 11:177–184

Refolo LM, Malester B, LaFrancois J, Bryant-Thomas T, Wang R, Tint G, Sambamurti K, DuV K, Pappolla M (2000) Hypercholesterolemia accelerates the Alzheimer's amyloid pathology in a transgenic mouse model. *Neurobiol Dis.* 7:321–331

Refolo LM, Pappolla MA, LaFrancois J, Malester B, Schmidt SD, Thomas-Bryant T, Tint GS, Wang R, Mercken M, Petanceska SS, DuV KE (2001) A cholesterol-lowering drug reduces beta-amyloid pathology in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis.* 8:890–899

Reisberg B, Borenstein J, Salob SP, Ferris SH, Franssen E, Georgotas A (1987) Behavioral symptoms in Alzheimer's disease. phenomenology and treatment. *J. Clin. Psychiatry.* 48:9-15.

Reitz C, Tang MX, Schupf N, Manly JJ, Mayeux R, Luchsinger JA (2010) A summary risk score for the prediction of Alzheimer disease in elderly persons. *Arch Neurol.* 67(7):835-41.

Repantis D, Laisney O, Heuser I (2010) Acetylcholinesterase inhibitors and memantine for neuroenhancement in healthy individuals: a systematic review. *Pharmacol Res.* 61(6):473-81. Review.

Resende R, Moreira PI, Proença T, Deshpande A, Busciglio J, Pereira C, Oliveira CR (2008) Brain oxidative stress in a triple-transgenic mouse model of Alzheimer disease. *Free Radic Biol Med.* 44(12):2051-7.

Rockwell E, Jackson E, Vilke (1994) A study of delusions in a large cohort of Alzheimer's disease patients. *Am J Geriatr Psychiatry.* 2:157-164.

Rodgers RJ, Dalvi A (1997) Anxiety, defence and elevated plus-maze. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews.* 21:801-810.

Rodrigues SM, LeDoux JE, Sapolsky RM (2009) The influence of stress hormones on fear circuitry. *Annu Rev Neurosci.* 32:289-313.

Rodríguez JJ, Jones VC, Tabuchi M, Allan SM, Knight EM, LaFerla FM, Oddo S, Verkhratsky A (2008) Impaired adult neurogenesis in the dentate gyrus of a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *PLoS One.* 3;3(8):e2935.

Rodríguez Álvarez M y Sánchez Rodríguez JL (2004) *Reserva cognitiva y demencia. Anales de psicología* 20(2): 175-186

Rogaev EI, Sherrington R, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Lyang Y, Chi H, Lin C, Holman K, Tsuda T, Mar L, Sorbi S, Nacmias B, Piacentini S, Amaducci L, Chumakov I, Cohen D, Lannfelt L, Fraser PE, Rommens JM, St George-Hyslop P (1995) Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's type 3 gene. *Nature.* 376:775–778

Rosario ER, Carroll JC, Oddo S, LaFerla FM, Pike CJ (2006) Androgens regulate the development of neuropathology in a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 26(51):13384-9.

Rosenzweig MR, Krech D, Bennett EL, Diamond MC (1962). Effects of environmental complexity and training on brain chemistry and anatomy: a replication and extension. *Journal of Comparative and Physiological Psychology.* 55:429-437.

Roses AD (1994) Apolipoprotein E affects the rate of Alzheimer Disease expression: β -amyloid burden is a secondary consequence dependent on APOE genotype and duration of disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 53, 429-37.

Roses AD (1997) A model for susceptibility polymorphisms for complex diseases: apolipoprotein E and Alzheimer disease. *Neurogenetics.* 1(1):3-11

Rubin EH, Morris JC, Storandt M (1987) Behavioral changes in patients with mild senile dementia of the Alzheimer's type. *Psychiatr Res.* 21:55-62.

Samadi A, Valderas C, de los Ríos C, Bastida A, Chioua M, González-Lafuente L, Colmena I, Gandía L, Romero A, Del Barrio L, Martín-de-Saavedra MD, López MG, Villarroya M, Marco-Contelles J (2011) Cholinergic and neuroprotective drugs for the treatment of Alzheimer and neuronal vascular diseases. II. Synthesis, biological assessment, and molecular modelling of new tacrine analogues from highly substituted 2-aminopyridine-3-carbonitriles. *Bioorg Med Chem.* 19(1):122-33.

Sandi C, Venero C, Cordero MI (2001) Estrés, memoria y trastornos asociados. Implicaciones en el daño cerebral y el envejecimiento. Barcelona: (Ed) Ariel Neurociencia

Sapolsky R (1986) Glucocorticoid toxicity in the hippocampus: reversal by supplementation with brain fuels. *Journal of Neuroscience.* 6: 2240-2247.

Sapolsky RM (1992) Stress, the aging brain, and the mechanisms of neuron death. Mit Press, London.

Sapolsky RM (1993) Potential behavioral modification of glucocorticoid damage to the hippocampus. *Behavioural Brain Research.* 57:175-182.

Sapolsky RM (2003) Stress and plasticity in the limbic system. *Neurochem Res.* 28(11):1735-42. Review.

Sapolsky RM, Meaney MJ, McEwen BS (1985) The development of the glucocorticoid receptor system in the rat limbic brain. III. Negative-feedback regulation. *Brain Res.* 350(1-2):169-73.

Sapolsky RM, Uno H, Rebert CS, Finch CE (1990) Hippocampal damage associated with prolonged glucocorticoid exposure in primates. *Journal of Neuroscience.* 10: 2897-2902.

Sara SJ (1989) Noradrenergic-cholinergic interaction: its possible role in memory dysfunction associated with senile dementia. *Arch Gerontol Geriatr Suppl.* 1:99-108. Review.

Sarrieu A, Sharma S, Meaney MJ (1988) Postnatal development and environmental regulation of hippocampal glucocorticoid and mineralocorticoid receptors. *Developmental Brain Research.* 43:158-162.

Satlin A, Volicer L, Stopa EG, Harper D (1995) Circadian locomotor activity and core-body temperature rhythms in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 16(5):765-71.

Sawamura N, Morishima-Kawashima M, Waki H, Kobayashi K, Kuramochi T, Frosch MP, Ding K, Ito M, Kim TW, Tanzi RE, Oyama F, Tabira T, Ando S, Ihara Y (2000) Mutant presenilin 2 transgenic mice. A large increase in the levels of Abeta 42 is presumably associated with the low density membrane domain that contains decreased levels of glycerophospholipids and sphingomyelin. *J Biol Chem* 275:27901–27908

Scarr-Salapack S, Williams ML (1973) The effects of early stimulation on low birthweight infants. *Child Development.* 33: 94-101.

Scattoni ML, Gasparini L, Alleva E, Goedert M, Calamandrei G, Spillantini MG (2010) Early behavioural markers of disease in P301S tau transgenic mice. *Behav Brain Res.* 208(1):250-7.

Schanberg SM, Field TM (1987) Sensory deprivation stress and supplemental stimulation in the rat pup and preterm human neonate. *Child Dev.* 58(6):1431-47.

Schenk D, Barbour R, Dunn W, Gordon G, Grajeda H, Guido T, Hu K, Huang J, Johnson-Wood K, Khan K, Kholodenko D, Lee M, Liao Z, Lieberburg I, Motter R, Mutter L, Soriano F, Shopp G, Vasquez N, Vandever C, Walker S, Wogulis M, Yednock T, Games D, Seubert P (1999) Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature*. 400:173–177

Schneider LS (1998) Cholinergic deficiency in Alzheimer's disease. Pathogenic model. *American Journal of geriatric Psychiatry*. 6 (2 Suppl):S49-55.

Selkoe DJ (1993) Amyloid protein and Alzheimer disease. *Scientific American*. 54-61.

Sekler A, Jiménez JM, Rojo L, Pastene E, Fuentes P, Slachevsky A, Maccioni RB (2008) Cognitive impairment and Alzheimer's disease: Links with oxidative stress and cholesterol metabolism. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 4(4):715-22.

Sherrington S, Rogaev EI, Liang Y, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Chi H, Lin C, Li G, Holman K, Tsuda T, Mar L, Foncin JF, Bruni AC, Montesi MP, Sorbi S, Rainero I, Pinessi L, Nee L, Chumakov I, Pollen D, Brookes A, Sanseau P, Polinsky RJ, Wasco W, Da Silva HAR, Haines JL, Pericak-Vance MA, Tanzi RE, Roses AD, Fraser PE, Rommens JM, St George-Hyslop PH (1995) Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature*. 375:754–760

Shinosaki K, Nishikawa T, Takeda M (2000) Neurobiological basis of behavioral and psychological symptoms in dementia of the Alzheimer type. *Psychiatry Clin Neurosci*. 54(6):611-20. Review.

Solkoff N, Yaffe S, Weintraub D, Blase B (1969) Effects of handling on the subsequent development of premature infants. *Developmental Psychology*. 1:765-768.

Sorrells SF, Caso JR, Munhoz CD, Sapolsky RM (2009) The stressed CNS: when glucocorticoids aggravate inflammation. *Neuron*. 64(1):33-9. Review.

Soscia SJ, Kirby JE, Washicosky KJ, Tucker SM, Ingelsson M, Hyman B, Burton MA, Goldstein LE, Duong S, Tanzi RE, Moir RD (2010) The Alzheimer's disease-associated amyloid beta-protein is an antimicrobial peptide. *PLoS One*. 5(3):e9505.

Sparks DL, DeKosky ST, Markesbery WR (1988) Alzheimer's disease. Aminergic-cholinergic alterations in hypothalamus. *Arch Neurol*. 45(9):994-9.

Stamatakis A, Pondiki S, Kitraki E, Diamantopoulou A, Panagiotaropoulos T, Raftogianni A, Stylianopoulou F (2008) Effect of neonatal handling on adult rat spatial learning and memory following acute stress. *Stress*. 11(2):148-59.

Stackman RW, Eckenstein F, Frei B, Kulhanek D, Nowlin J, Quinn JF (2003) Prevention of age-related spatial memory deficits in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease by chronic Ginkgo biloba treatment. *Exp Neurol*. 184(1):510-20.

Steimer T, Escorihuela RM, Fernández-Teruel A, Driscoll P (1998) Long-term behavioural and neuroendocrine changes in Roman high-(RHA/Verh) and low-(RLA-Verh) avoidance rats following neonatal handling. *Int J Dev Neurosci*. 16(3-4):165-74.

Stein-Behrens B, Mattson MP, Chang I, Yeh M, Sapolsky R (1994) Stress exacerbates neuron loss and cytoskeletal pathology in the hippocampus. *J Neurosci*. 14(9):5373-80.

Stern Y (2002) What is cognitive reserve? Theory and research application of the reserve concept. *J Int Neuropsychol Soc*. 8(3):448-60. Review.

Stern Y (2006) Cognitive reserve and Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord*. 20(3 Suppl 2):S69-74. Review.

Stern Y (2009) Cognitive reserve. *Neuropsychologia*. 47(10):2015-28.Review.

Sterniczuk R, Dyck RH, Laferla FM, Antle MC (2010a) Characterization of the 3xTg-AD mouse model of Alzheimer's disease: part 1. Circadian changes. *Brain Res*. 1348:139-48.

Sterniczuk R, Antle MC, Laferla FM, Dyck RH (2010b) Characterization of the 3xTg-AD mouse model of Alzheimer's disease: part 2. Behavioral and cognitive changes.*Brain Res*. 1348:149-55.

Streng J (1971) Open-field behavior in four inbred mouse strains. *Can J Psychol*. 25(1):62-8

Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D, Pericak-Vance M, Enghild J, Salvesen GS, Roses AD (1993) Apolipoprotein E: high avidity binding to β -amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA*. 90 (5):1977–1981

Sturchler-Pierrat C, Abramowski D, Duke M, Wiederhold KH, Mistl C, Rothacher S, Ledermann B, Bürki K, Frey P, Paganetti PA, Waridel C, Calhoun ME, Jucker M, Probst A, Staufenbiel M, Sommer B (1997) Two amyloid precursor protein transgenic mouse models with Alzheimer disease-like pathology. *Proc Natl Acad Sci USA*. 94:13287–13292

Swaab DF, Fliers E, Fisser B (1985) The vasopressin containing neurons in the human brain; changes during ageing and senile dementia. *Br J Clin Pract Suppl*. 39:7-10.

Swaab DF, Van Someren EJ, Zhou JN, Hofman MA (1996) Biological rhythms in the human life cycle and their relationship to functional changes in the suprachiasmatic nucleus. *Prog Brain Res*. 111:349-68. Review.

Swanwick GR, Kirby M, Bruce I, Buggy F, Coen RF, Coakley D, Lawlor BA (1998) Hypothalamic-pituitary-adrenal axis dysfunction in Alzheimer's disease: lack of association between longitudinal and cross-sectional findings. *Am J Psychiatry*. 155(2):286-9.

Sze C, Bi H, Kleinschmidt-DeMasters BK, Martin LJ (2000) N-Methyl-D-aspartate receptor subunit proteins and their phosphorylation status are altered selectively in Alzheimer's disease. *J. Neurol. Sci.* 182:151-159.

Tabuchi M, Yamaguchi T, Iizuka S, Imamura S, Ikarashi Y, Kase Y (2009) Ameliorative effects of yokukansan, a traditional Japanese medicine, on learning and non-cognitive disturbances in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *J Ethnopharmacol.* 122(1):157-62.

Tanemura K, Murayama M, Akagi T, Hashikawa T, Tominaga T, Ichikawa M, Yamaguchi H, Takashima A (2002) Neurodegeneration with tau accumulation in a transgenic mouse expressing V337M human tau. *J Neurosci.* 22:133-141

Tang AC, Akers KG, Reeb BC, Romeo RD, McEwen BS (2006) Programming social, cognitive, and neuroendocrine development by early exposure to novelty. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103(42):15716-21.

Tang X, Sanford LD (2005) Home cage activity and activity-based measures of anxiety in 129P3/J, 129X1/SvJ and C57BL/6J mice. *Physiol Behav.* 84(1):105-15.

Tate B, Aboody-Guterman KS, Morris AM, Walcott EC, Majojcha RE, Marotta CA (1992) Disruption of circadian regulation by brain grafts that overexpress Alzheimer beta/A4 amyloid. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89(15):7090-4.

Thal LJ (2000) Anti-inflammatory drugs and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 21:449-450

Tobeña A, Fernández-Teruel A (2010) Modelos animales en psiquiatría. En: Vallejo Ruiloba J, Leal Cercós C (Eds) *Tratado de psiquiatría*. Vol 1. 2º edición. Barcelona: Ars Médica, pp.414-426.

Toledano A, Alvarez MI (2004) Lesions and dysfunctions of the nucleus basalis as Alzheimer's disease models: general and critical overview and analysis of the long-term changes in several excitotoxic models. *Curr Alzheimer Res* 1(3):189-214.

Tomonaga M, Yamanouchi H, Tohgi H (1982) Clinicopathologic study of progressive subcortical vascular encephalopathy (Binswanger type) in the elderly. *J Am Geriatr Soc*. 30:524-529.

Touma C, Palme R, Sachser N (2004a) Analyzing corticosterone metabolites in fecal samples of mice: a noninvasive technique to monitor stress hormones. *Horm Behav*. 45(1):10–22.

Touma C, Ambrée O, Görtz N, Keyvani K, Lewejohann L, Palme R, Paulus W, Schwarze-Eicker K, Sachser N (2004b) Age- and sex-dependent development of adrenocortical hyperactivity in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2004 Aug;25(7):893-904.

Tremml P, Lipp HP, Müller U, Wolfer DP (2002) Enriched early experiences of mice underexpressing the beta-amyloid precursor protein restore spatial learning capabilities but not normal openfield behavior of adult animals. *Genes Brain Behav*. 1(4):230-41.

Tseng BP, Kitazawa , LaFerla FM (2004) Amyloid B-peptide: The Inside Story. *Curr. Alzh. Res*. 1:231-39.

Turner PR, O'Connor K, Tate WP, Abraham WC (2003) Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory. *Prog. Neurobiol* 70 (1):1–32.

Van Dam D, D'Hooge R, Staufenbiel M, Van Ginneken C, Van Meir F, De Deyn PP (2003) Age-dependent cognitive decline in the APP23 model precedes amyloid deposition. *Eur J Neurosci* 17:388–396

Van Someren EJ (2000) Circadian and sleep disturbances in the elderly. *Exp Gerontol.* 35(9-10):1229-37.

Vicens P, Redolat R, Carrasco MC (2002) Effects of early spatial training on water maze performance: a longitudinal study in mice. *Exp Gerontol.* 37(4):575-81.

Vicens P, Bernal MC, Carrasco MC, Redolat R (1999) Previous training in the water maze: differential effects in NMRI and C57BL mice. *Physiol Behav.* 67(2):197-203.

Vilalta-Franch J, López-Pousa S, Turon-Estrada A, Lozano-Gallego M, Hernández-Ferrándiz M, Pericot-Nierga I, Garre-Olmo J (2010) Syndromic association of behavioral and psychological symptoms of dementia in Alzheimer disease and patient classification. *Am J Geriatr Psychiatry.* 18(5):421-32.

Vivo M, Cañete T, Blázquez G, Johansson B, Rosa R, Oddo S, Navarro X, LaFerla FM, Tobeña A, Fernández-Teruel A, Giménez-Llort L (2006) 3xTgAD mice exhibit memory and BSPD deficits at ages preceding AB plaque formation. *5th Forum of European Neuroscience- FENS, Abstract published in FENS Forum Abstracts.*

Viña J, Lloret A (2010) Why women have more Alzheimer's disease than men: gender and mitochondrial toxicity of amyloid-beta peptide. *J Alzheimers Dis.* 20 Suppl 2:S527-33. Review.

Vloeberghs E, van Dam D, Engelborghs S, Nagels G, Staufenbiel M, de Deyn PP (2004) Altered circadian locomotor activity in APP23 mice: a model for BPSD disturbances. *Eur J Neurosci.* 200:2757–66.

Volicer L, Harper DG, Manning BC, Goldstein R, Satlin A (2001) Sundowning and circadian rhythms in Alzheimer's disease. *Am J Psychiatry.* 158:704–11.

Von Bernhardi R, (2007) Glial cell dysregulation: a new perspective on Alzheimer disease. *Neurotox Res.* 12(4):215-32. Review.

Wahlsten D, Metten P, Phillips TJ, Boehm SL 2nd, Burkhart-Kasch S, Dorow J, Doerksen S, Downing C, Fogarty J, Rodd-Henricks K, Hen R, McKinnon CS, Merrill CM, Nolte C, Schalomon M, Schlumbohm JP, Sibert JR, Wenger CD, Dudek BC, Crabbe JC (2003) Different data from different labs: lessons from studies of gene-environment interaction. *J Neurobiol.* 54(1):283-311. Review.

Wakshlak A, Weinstock M (1990) Neonatal handling reverses behavioral abnormalities induced in rats by prenatal stress. *Physiol Behav.* 48(2):289-92.

Walsh RN, Cummins RA (1976) The Open-Field Test: a critical review. *Psychol Bull.* 83(3):482-504. Review.

Wang PS, Schneeweiss S, Avorn J, Fischer MA, Mogun H, Solomon DH, Brookhart MA (2005) Risk of death in elderly users of conventional vs. atypical antipsychotic medications. *N Engl J Med.* 353(22):2335-41.

Waring SC, Rosenberg RN (2008) Genome-wide association studies in Alzheimer disease. *Arch. Neurol.* 65 (3): 329–34.

Weaver IC, Diorio J, Seckl JR, Szyf M, Meaney MJ (2004) Early environmental regulation of hippocampal glucocorticoid receptor gene expression: characterization of intracellular mediators and potential genomic target sites. *Ann N Y Acad Sci.* 1024:182-212. Review.

Weeber EJ, Beffert U, Jones C, Christian JM, Forster E, Sweatt JD, Herz J (2002) Reelin and ApoE receptors cooperate to enhance hippocampal synaptic plasticity and learning. *J Biol Chem.* 277(42):39944-52.

Wei L, David A, Duman RS, Anisman H, Kaffman A (2010) Early life stress increases anxiety-like behavior in Balbc mice despite a compensatory increase in levels of postnatal maternal care. *Horm Behav.* 57(4-5):396-404.

Wenk GL (2003) Neuropathologic changes in Alzheimer's disease. *J Clin Psychiatry* 64 Suppl 9:7-10.

Westerman MA, Cooper-Blacketer D, Mariash A, Kotilinek L, Kawarabayashi T, Younkin LH, Carlson GA, Younkin SG, Ashe KH (2002) The relationship between Abeta and memory in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 22:1858–1867

Whishaw IQ (1995) A comparison of rats and mice in a swimming pool place task and matching to place task: Some surprising differences. *Physiol. Behav.* 58:687– 693.

White H, Pieper C, Schmader K (1998) The association of weight change in Alzheimer's disease with severity of disease and mortality: a longitudinal analysis. *J Am Geriatr Soc.* 46:1223–7.

White HK, McConnell ES, Bales CW, Kuchibhatla M (2004) A 6-month observational study of the relationship between weight loss and behavioral symptoms in institutionalized Alzheimer's disease subjects. *J Am Med Dir Assoc* 5:89–97.

Whitehouse PJ, Price DL, Clark AW, Coyle JT, DeLong MR (1981) Alzheimer disease: evidence for selective loss of cholinergic neurons in the nucleus basalis. *Ann Neurol.* 13:243–248

Whitehouse PJ, Price DL, Struble RG, Clark AW, Coyle JT, DeLong MR (1982) Alzheimer's disease and senile dementia: Loss of neurons in the basal forebrain. *Science*. 215:1237–1239.

Wilson DA, Willner J, Kurz EM, Nadel L (1986) Early handling increases hippocampal long-term potentiation in young rats. *Behav Brain Res*. 21(3):223-7.

Wilson RS, Krueger KR, Gu L, Bienias JL, Mendes de Leon CF, Evans DA (2005) Neuroticism, extraversion, and mortality in a defined population of older persons. *Psychosom Med*. 67(6):841-5.

Wilson RS, Mendes de Leon CF, Barnes LL, Schneider JA, Bienias JL, Evans DA, Bennett DA (2002) Participation in Cognitively Stimulating Activities and Risk of Incident Alzheimer Disease. *JAMA* 287(6):742-748

Wilson RS, Tang Y, Aggarwal NT, Gilley DW, McCann JJ, Bienias JL, Evans DA (2006) Hallucinations, cognitive decline, and death in Alzheimer's disease. *Neuroepidemiology*. 26(2):68-75.

Wirhth O, Weis J, Szczygielski J, Multhaup G, Bayer TA (2006) Axonopathy in an APP/PS1 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*. 111:312–329

Witting W, Kwa IH, Eikelenboom P, Mirmiran M, Swaab DF (1990) Alterations in the circadian rest-activity rhythm in aging and Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry*. 27(6):563-72.

Wolfer DP, Lipp HP (2000) Dissecting the behaviour of transgenic mice: is it the mutation, the genetic background, or the environment? *Exp Physiol*. 85(6):627-34. Review.

Wolfer DP, Stagljar-Bozicevic M, Errington ML, Lipp HP (1998) Spatial Memory and Learning in Transgenic Mice: Fact or Artifact? *News Physiol Sci.* 13:118-123.

Wollmer MA (2010) Cholesterol-related genes in Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta.* 1801(8):762-73.

Wong R (1972) Infantile handling and associative processes of rats, *Br J Psychol.* 63:101–108.

Woodruff-Pak DS (2008) Animal models of Alzheimer's disease: Therapeutic implications. *Journal of Alzheimer's Disease* 15:507-521.

Xi G, Zhang X, Zhang L, Sui Y, Hui J, Liu S, Wang Y, Li L, Zhang Z (2011) Fluoxetine attenuates the inhibitory effect of glucocorticoid hormones on neurogenesis in vitro via a two-pore domain potassium channel, TREK-1. *Psychopharmacology.* 214(3):747-59.

Xie H, Litersky JM, Hartigan JA, Jope RS, Johnson GV (1998) The interrelationship between selective tau phosphorylation and microtubule association. *Brain Res.* 798 (1-2):173-83.

Yao YY, Liu DM, Xu DF, Li WP (2007) Memory and learning impairment induced by dexamethasone in senescent but not young mice. *Eur J Pharmacol.* 574(1):20-8.

Yoshitake T, Reenilä I, Ogren SO, Hökfelt T, Kehr J (2003) Galanin attenuates basal and antidepressant drug-induced increase of extracellular serotonin and noradrenaline levels in the rat hippocampus. *Neurosci Lett.* 339(3):239-42.

Yuk DY, Lee YK, Nam SY, Yun YW, Hwang DY, Choi DY, Oh KW, Hong JT (2009) Reduced anxiety in the mice expressing mutant (N141I) presenilin 2. *J Neurosci Res.* 87(2):522-31.

Zaharia MD, Kulczycki J, Shanks N, Meaney MJ, Anisman H (1996) The effects of early postnatal stimulation on Morris water-maze acquisition in adult mice: genetic and maternal factors. *Psychopharmacology*. 128(3):227-39.

Zanettini C, Carola V, Lo Iacono L, Moles A, Gross C, D'Amato FR (2010) Postnatal handling reverses social anxiety in serotonin receptor 1A knockout mice. *Genes Brain Behav*. 9(1):26-32.

Zhang J, Gorostiza OF, Tang H, Bredesen DE, Galvan V (2010) Reversal of learning deficits in hAPP transgenic mice carrying a mutation at Asp664: a role for early experience. *Behav Brain Res*. 206(2):202-7.

Zhang M, Cai JX (2008) Neonatal tactile stimulation enhances spatial working memory, prefrontal long-term potentiation, and D1 receptor activation in adult rats. *Neurobiol Learn Mem*. 89(4):397-406.

Zhang Y, McLaughlin R, Goodyer C, LeBlanc A, (2002) Selective cytotoxicity of intracellular amyloid beta peptide1-42 through p53 and Bax in cultured primary human neurons. *J. Cell. Biol*. 156:519-29.

Zhu SW, Codita A, Bogdanovic N, Hjerling-Leffler J, Ernfors P, Winblad B, Dickins DW, Mohammed AH (2009) Influence of environmental manipulation on exploratory behaviour in male BDNF knockout mice. *Behav Brain Res*. 197(2):339-46.

Zou B, Golarai G, Connor JA, Tang AC (2001) Neonatal exposure to a novel environment enhances the effects of corticosterone on neuronal excitability and plasticity in adult hippocampus. *Brain Res Dev Brain Res*. 130(1):1-7.