

Trabajo de fin de grado

Grado de Medicina

**ESTUDIO DE LOS DÉFICITS COGNITIVOS Y SOCIALES
PRECOCES EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER A A
TRAVÉS DEL MODELO DE RATÓN HEMBRA 3xTg-AD**

Autor: Marta Zacarés Masanet

Tutor: Francisco Ros Bernal

Departamento: Unidad Predepartamental de Medicina

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	8
1.1- Definición de Enfermedad de Alzheimer y epidemiología	8
1.2- Clínica de la Enfermedad de Alzheimer	8
1.3- Evidencias anatomopatológicas en la EA	9
1.4. La neurodegeneración en la enfermedad de Alzheimer	11
1.5. La neuroinflamación en la enfermedad de Alzheimer	11
1.6. Diagnóstico	12
1.7. Tratamiento	13
1.8. Enfermedad de Alzheimer, genética y factores de riesgo	13
1.9. Correlación anatomopatológica en la enfermedad de Alzheimer	15
1.10. Modelos animales para la enfermedad de Alzheimer	16
1.11. Objetivos del presente trabajo	16
2. MATERIAL Y MÉTODOS	18
2.1 Animales empleados	18
2.2 Pruebas de comportamiento realizadas	18
2.2.1. Test de laberinto elevado	19
2.2.2 Test de campo abierto	20
2.2.3 Test de reconocimiento de objetos.	21
2.3. Análisis estadístico	23
3. RESULTADOS:	24
3.1 Test de laberinto elevado:	24
3.2 Test de campo abierto:	27
3.3 Test de NORT	30
4. DISCUSIÓN:	35
4.1 Discusión del modelo empleado	35
4.2 Discusión de los resultados obtenidos	36
5. AGRADECIMIENTOS	39
6. BIBLIOGRAFÍA	40

Resumen

Palabras clave:

Enfermedad de Alzheimer

3xTg-AD

Cognición

Comportamiento

Ansiedad

Campo abierto

Memoria

La Enfermedad de Alzheimer es una demencia que cursa de forma progresiva con déficits cognitivos, pero también de comportamiento. Para el estudio de la enfermedad se han empleado diferentes modelos de ratón, entre los cuales destaca el modelo 3xTg-AD, el cual se asemeja más a la EA humana que otros modelos de ratón desarrollados. En este trabajo hemos comparado hembras 3xTg-AD con hembras control, en una serie de pruebas, como son el laberinto elevado, la prueba de campo abierto y el test NOR, que valoran la capacidad cognitiva y aspectos comportamentales como la ansiedad. Los ratones transgénicos presentaron un menor número total de entradas en los brazos del laberinto elevado, lo que refleja hipoactividad. También encontramos un mayor cruce de líneas por parte de estos ratones en la prueba de campo abierto, y en la prueba de reconocimiento de objetos, los ratones 3xTg-AD mostraron preferencia por el objeto novedoso frente al control. El modelo 3xTgAD en hembras puede ser un buen modelo de estudio de la EA en estadios tempranos aunque no se evidencian deterioro cognitivo a los tres meses, lo que podría deberse al bajo tamaño muestral empleado.

Keywords:

Alzheimer's disease

3xTg-AD

Cognition

Behavior

Anxiety

Open-field

Memory

Alzheimer's disease is a dementia that progresses with cognitive deficits, but also behavioral deficits. Different mouse models have been used to study the disease, including the 3xTg-AD model, which is more similar to human AD than other mouse models developed. In this work we have compared 3xTg-AD females with control females, in a series of tests: the elevated maze test, the open field test and the NOR test, which assess cognitive capacity. We observed that the transgenic mice had a lower total number of entries in the arms of the elevated labyrinth, reflecting hypoactivity. We also found a greater crossing of lines by these mice in the open field test, and in the object recognition test, the 3xTg-AD mice showed preference for the novel object. The 3xTgAD female model may be a good model for the study of AD during early stages, although there is no evidence of cognitive alterations at three months of age, it could be due to the low sample size used.

Extended Summary

Dementias as a whole has been described as "the silent epidemic" (1) and according to the WHO report on dementia, carried out in 2013, the increase in population aging (especially due to the increase in life expectancy) will cause this "global epidemic" to continue growing. Within the set of dementias, Alzheimer's disease (AD) is currently the most common form of dementia in the West and the most prevalent neurodegenerative disease (3) hence lies the importance of its study. Clinically, AD is characterized by cognitive, neuropsychiatric, behavioral and functional alterations. Anatomopathologically, AD is characterized by the presence of senile plaques (SP), consisting mainly of amyloid beta protein (A β), and intracellular neurofibrillary tangles (NFT) conformed significantly by abnormally phosphorylated tau protein (15); being able to also find neurodegeneration and neuroinflammation.

Total penetrance mutations have been identified in three genes that lead to early-onset familial AD: i) the APP gene on chromosome 21, and ii-iii) the two presenilin genes (PSEN1, on chromosome 14 and PSEN2, on chromosome 1), the first being the locus most frequently involved in cases of early-onset AD (accounting for 70%).

Precisely the 3xTgAD mouse line, which is what we have used in our work, and which was developed by Oddo et al. (38), is a transgenic triple model generated by co-injection of two transgenes that contained mutations in the APP gene and tau in mice that had a mutation in the presynilin gene. This triple transgenic mutation expressing APP, PS1 and Tau contains A β plates and neurofibrillary tangles, unlike most transgenic mice with one or two mutations, which resemble more rare cases of AD, with deposits of amyloid and tau hyperphosphorylated but without neurofibrillary tangles. One of our objectives in this project is to evaluate the behavior of 3xTg-AD female mice through a series of tests commonly used to evaluate cognitive abilities (spatial memory test or NOR) as well as anxiety (evaluated by the open field test and the elevated maze test).

In other studies, it has been observed that 3xTg-AD mice have a higher level of anxiety, or a predisposition to a lower threshold of response to fear, which causes a decrease in exploratory behavior and ¿greater? ambulation.

In the elevated maze test, it was observed that the number of entries in closed arms and the total number of entries lower in the 3xTgAD mice, being this statistic statistically significant ($p < 0.05$), which reflects hypoactivity in transgenic mice. These data correspond with what was observed in other studies. On the other hand, the time spent open arms and in closed arms

and the time elapsed in the center of the labyrinth is similar in both groups, thus not being significantly correlated. Finally, the number of times that the head is submerged is higher in the control mice, without reaching a significant difference either.

In the open-field test, the number of line crosses is significantly higher in the 3xTgAD mice than in the control group ($p < 0.01$), which reflects, in contrast to the other test, some hyperactivity. Also the number of entries in the central square and the time in the central square was higher in the 3xTgAD mice, but without being significant. The number of times they were lifted was also higher in the 3xTgAD; but we didn't find a significant correlation in all of these parameters. Both the freezing's state time and the time the mice spent preening were higher in the controls, although we did not find a significant correlation between these parameters and the type of mouse. In other studies contradictory results have been found, in some of them the 3xTgAD mice show hypoactivity while in others a higher activity.

Regarding cognitive deterioration, it is known to be exacerbated in an age-dependent manner in 3xTg-AD mice. The long-term retention deficits in 3xTg-AD mice begin to manifest at the age of 4-5 months, and short-term memory is affected by the age of 6-7 months. In the NOR test, of object recognition there are studies in which no differences have been found between genotypes, the mice passing the same time approximately with each object, which seems to indicate that the mice do not have a preference for the new object (138); while in others it has been seen that the 3xTg-AD were deficient in retention in relation to the controls, being unlikely that this deficiency is due to apathy since the initial exploration of the object did not find differences (112). There are contradictions about when 3xTg-AD mice develop a deficit in this task; in some, short-term memory deficits were described in this test in 3xTg-AD females at 6 months of age (139,140), and in others there were no differences until 9 months of age (141,142). In our case, we have not found differences either, on the contrary, the transgenic mice have presented a greater preference for the novel object than the controls. Yes, we recorded a greater crossing of lines both in the test phase and in the test phase, this parameter being significant in the test phase ($p < 0.01$).

One of the limitations of our study and why we believe that some of our results are inconclusive is the low sample of mice.

which is the number of entries in the closed arms and the total number of entries in the mice, 3xTgAD, this last data being statistically significant ($p < 0.05$), which reflects a hypoactivity in transgenic mice. These data correspond to what was observed in other studies. On the other hand, both the time spent and the closed arms and the time spent in the center of the

labyrinth is similar in both groups, thus not being significantly correlated. Finally, the number of times your head is superior in the control of mice, there can be no significant difference.

In the open-field test, the number of line crosses is higher in the 3xTgAD mice than in the control group ($p < 0.01$), which reflects, in contrast to the other test, some hyperactivity. Also the number of entries in the central square and the time elapsed in the central square was higher in the 3xTgAD mice, but without being significant. The number of times it was lifted was also higher in the 3xTgAD mice, and on the contrary the number of stretches was slightly higher in the controls; no correlation is found to be so important none of these parameters. Both the "freezing" time and the time the mice spent preening were higher in the controls, although no significant correlation was found between these parameters and the type of mouse. In other studies contradictory results were found, since in some cases 3xTgAD show hypoactivity while in others, a greater activity.

Regarding cognitive deterioration, it is known to be exacerbated in an age-dependent manner in 3xTg-AD mice. The long-term retention deficits in 3xTg-AD mice begin to manifest at the age of 4-5 months, and short-term memory are affected by the age of 6-7 months. In the NOR test, object recognition studies exist in which the differences between genotypes have not been found, the mice passing the same time with each object, which seems to indicate that the mice do not have a preference for the new object (138) ; while in others it has been seen that the 3xTg-AD were deficient in retention in relation to the controls, being unlikely that this deficiency is due to apathy since the initial exploration of the object is not the differences. There are contradictions about when 3xTg-AD mice lack of development in this task; in some, short-term memory deficits were described in this test in 3xTg-AD females at 6 months of age, and in others there were no differences until 9 months of age. In our case, we have not found any difference, rather on the contrary, the transgenic mice have presented a greater preference for the novel object than the controls. We did register a greater crossing of lines both in the test phase and in the test phase, this parameter being significant in the test phase ($p < 0.01$).

One of the limitations of our study and why we believe that some of our results are inconclusive is the low sample of mice.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Definición de Enfermedad de Alzheimer y epidemiología

En los años 80, las demencias en su conjunto fueron descritas como "la epidemia silenciosa" (1) y según el informe de la OMS sobre la demencia, realizado en el año 2013, el aumento del envejecimiento de la población (debido especialmente al aumento de la esperanza de vida) provocará que esta "epidemia global" continúe creciendo. De esta manera se calcula que para el año 2050 las personas mayores de 65 años conformarán el 22% de la población mundial (2). Dentro del conjunto de las demencias, la Enfermedad de Alzheimer (EA) es actualmente la forma más común de demencia en Occidente y la enfermedad neurodegenerativa más prevalente (3) de ahí radica la importancia de su estudio. La EA es una enfermedad irreversible, que comienza de forma insidiosa y cursa de forma progresiva. La prevalencia global de la EA en Europa se estima en 5.05%, siendo la prevalencia en los hombres del 3,31% y en mujeres del 7,13% (4), con una ratio aproximada 1:2.

El aumento de la edad y los antecedentes familiares positivos de demencia son los dos principales factores de riesgo de la EA. (5).

En general, se reconocen dos subgrupos a partir de la edad en que se manifiestan los primeros síntomas clínicos: i) EA de inicio temprano o EA familiar, con una edad de inicio menor de 65 años y ii) EA de inicio tardío o EA esporádica, presentándose en pacientes mayores de 65 años. El primer grupo representa el 1-5% de todos los casos mientras que el segundo engloba a más del 95% de los afectados. Aunque la mayoría de los pacientes desarrollan EA a una edad más avanzada, la investigación de las formas de inicio temprano han sido las que principalmente han proporcionado información valiosa sobre la patogénesis de la EA.

1.2. Clínica de la Enfermedad de Alzheimer

Clínicamente, la EA se caracteriza por alteraciones cognitivas, neuropsiquiátricas, del comportamiento y funcionales.

La manifestación clínica inicial suele ser la pérdida de la memoria, especialmente episódica (definida como la capacidad de recordar experiencias pasadas), que interfiere en las rutinas de la vida diaria (organización, gestión, etc) (6). Con el avance de la enfermedad se van manifestando progresivamente alteraciones en la memoria semántica y emocional, en las funciones ejecutivas, la atención, el lenguaje y la orientación espacial, así como alteraciones en el ritmo circadiano (7,8). Las alteraciones neuropsiquiátricas se pueden agrupar en cinco

(5): agresividad, agitación, psicosis, depresión y apatía, los denominados "síntomas psicológicos y conductuales de la demencia". Aunque es frecuente y está bien descrito en la EA, no está claro si estos síntomas son consecuencias de la progresión de la enfermedad, parte de la fisiopatología de la misma o ambas.

Aunque no existe a día de hoy una escala de dependencia para el paciente con EA, podríamos emplear el elaborado para otras enfermedades neurodegenerativas. La escala de Hoehn y Yahr es un sistema comúnmente utilizado para describir cómo progresa el grado de discapacidad en los síntomas de la enfermedad de Parkinson, definiendo cinco etapas. La etapa 1 indica una discapacidad mínima (compromiso unilateral con disfunción mínima o funcional) y la etapa 5 una discapacidad grave (permanece en una silla de ruedas o encamado si no tiene ayuda) (9). El deterioro visoespacial (10) y la disfunción motora grave (correspondiente a los estadios 4 y 5 de la Escala de Hoehn y Yahr) se vuelven más pronunciadas durante las etapas tardía y terminal de la enfermedad (11). Como consecuencia del impacto que todas las alteraciones anteriores tienen en la vida diaria, se producen las alteraciones funcionales que limitan mucho la autonomía del paciente e imposibilitan su capacidad de realizar tareas cotidianas convirtiéndose en los últimos estadios en una enfermedad invalidante.

En cuanto a la diferencia clínica entre hombres y mujeres, aunque la gravedad de la patología de la EA puede no diferir, la evidencia reciente sugiere que la relación entre la patología y el estado clínico sí puede ser específica de género. Barnes y cols., en un estudio muy mediático realizado con pacientes católicos practicantes con EA, crearon una medida global a partir de los hallazgos anatomopatológicos obtenidos en sus cerebros *post mortem*, examinando posteriormente la relación entre dicha medida, el diagnóstico clínico y el nivel de cognición de los pacientes, y discriminando los resultados entre hombres y mujeres. Observaron que un aumento de una unidad (según la medida definida) de la patología de EA se asociaba con un aumento de tres [3] veces en las probabilidades de EA clínica en hombres, en comparación con un aumento de más de veinte [20] veces en las probabilidades de EA clínica en mujeres (12).

1.3. Evidencias anatomopatológicas en la EA

A nivel macroscópico en el cerebro *post mortem* de una persona con EA se puede observar una atrofia que afecta mayoritariamente a los lóbulos temporales, y en menor medida en los estadios iniciales a los lóbulos frontales, parietales u occipitales. Esta atrofia es generalmente simétrica y difusa, lo cual se manifiesta tanto en el aumento en la profundidad de los surcos como en la disminución del espesor de las circunvoluciones. Con la progresión de la

enfermedad se produce una dilatación secundaria del sistema ventricular y una disminución del peso y volumen cerebrales (13).

Neuropatológicamente, la EA se caracteriza por unas lesiones muy características. Estas lesiones, en forma de depósitos proteicos, son fundamentalmente la formación de placas seniles (SP), constituidas mayoritariamente por la proteína beta amiloide ($A\beta$) extracelular (14) y los ovillos neurofibrilares intracelulares (NFT) conformados significativamente por proteína tau anormalmente fosforilada (15).

Braak y Braak describieron 6 estadios en la neuropatología de la EA dependiendo de las lesiones provocadas por la acumulación de $A\beta$ y de NFT; lesiones que muestran un patrón de progreso definido (estadios de Braak y Braak, I-VI). Las alteraciones más graves se encuentran en el hipocampo, el subiculum, la amígdala y las áreas de asociación neocorticales (16).

Los depósitos patológicos de $A\beta$, que se caracterizan por sus formas $A\beta_{1-40}$ y $A\beta_{1-42}$, son el producto proteolítico erróneo de una proteína transmembrana, la proteína precursora de amiloide o APP, que se genera al escindirse por la acción secuencial del complejo enzimático β -secretasa (BACE-1) y γ -secretasa. En condiciones no patológicas, la APP es escindida por la α -secretasa, lo que origina un $A\beta$ generado fisiológicamente por las neuronas y que, en bajas concentraciones, parece que desempeña un papel importante en la plasticidad sináptica y los procesos relacionados con la memoria (17–19). Muchos estudios han demostrado que los productos del procesamiento erróneo de APP desencadenan otros procesos neuropatológicos asociados con la EA, como el mal funcionamiento sináptico, la atrofia neuronal y la desintegración y pérdida sináptica (20), así como la disfunción mitocondrial, el estrés oxidativo y activación glial (21), los cuales comentaremos más adelante. Mientras que en las formas familiares de EA las mutaciones provocan un aumento de la producción o agregación de $A\beta$, en la EA esporádica parece ser que el fallo de los mecanismos de eliminación puede desempeñar un papel central (22).

Por su parte, la función principal de la proteína tau es incorporar monómeros de α y β tubulina a los microtúbulos neuronales, contribuyendo a su mantenimiento, estabilidad dinámica, y control de actividades sinápticas implicadas en la memoria y funciones cognitivas. Esta proteína es susceptible de ser fosforilada enzimáticamente y su fosforilación disminuye la afinidad por los microtúbulos, es decir tiene una actividad fosfodependiente, cuando se encuentra fosforilada se separa de los microtúbulos y permite su reorganización y cuando está desfosforilada se une a ellos. En circunstancias patológicas la proteína tau se hiperfosforila, lo que deriva en la agregación y formación de los NFT, lo que conlleva la muerte neuronal (23). Los NFT no son específicos de la EA (24–26), sino que se encuentran presentes en muchas patologías cerebrales e incluso se observan (por lo general, restringidas topográficamente y

cuantitativamente) en cerebros de sujetos con envejecimiento fisiológico. Esta presencia fisiológica parece sugerir que los NFT son, al menos en algunas condiciones, una respuesta secundaria a la lesión y no el factor etiológico desencadenante de la enfermedad.

1.4. La neurodegeneración en la enfermedad de Alzheimer

En la patología que cursa durante la EA, se ha observado también una neurodegeneración característica (27) que se distingue inicialmente por la lesión sináptica (28–30) seguida de la pérdida neuronal (31), que se acompaña también de la presencia de los NFT (32,33) asociada con una reactividad glial, tanto astrocítica o astrogliosis (34) como de proliferación de células de la microglía (35,36), tal y como describiremos en el siguiente apartado.

Esta reducción de proteínas sinápticas (37) y los cambios existentes tanto en la morfología como en la estructura sináptica (14) son otro hallazgo característico de la enfermedad. De hecho, muchos estudios han demostrado que, aunque se considera a la acumulación y distribución de NFT y SP como los principales rasgos anatomopatológicos de la EA, la pérdida y alteraciones sinápticas también son hallazgos neuropatológicos de alta prevalencia que deberían considerarse igualmente como rasgos distintivos de la enfermedad, e incluso que esta disfunción sináptica es un cambio que precede a la acumulación de los depósitos característicos como son los NFT y SP (38). Esto se basa en los resultados de varios estudios en los cuales se ha visto una fuerte asociación entre la capacidad cognitiva de un sujeto y el número de sinapsis (30,39–44). Parece ser que la pérdida de sinapsis y/o proteínas sinápticas está muy extendida en la EA y no se limita a una región específica de la corteza, pudiendo ser la base patológica de los diversos cambios neurocognitivos observados con la progresión de la enfermedad. De hecho, la pérdida de sinapsis tendría una mejor correlación con el estado cognitivo que cualquier otro de los marcadores patológicos específicos anteriormente señalados. Es por ello por lo que se precisan más estudios que caractericen los subtipos específicos de cambios sinápticos que pueden vincularse de una manera más definida con la EA (45).

1.5. La neuroinflamación en la enfermedad de Alzheimer

Son numerosos los estudios que intentan elucidar el papel de la neuroinflamación en la EA (46), aunque aún no está claro cuándo y de qué forma se pone en marcha este proceso. Aunque la inflamación es, en principio, una respuesta protectora, con la edad se producen cambios en ésta que hacen que aumenten las respuestas inflamatorias (47,48) incrementando

así la susceptibilidad a padecer muchas enfermedades, incluyendo la EA. Se ha demostrado que los efectos de la inflamación glial en la EA pueden ser beneficiosos en sus etapas iniciales, pero dañinos si están presentes de forma crónica (49–51).

La neuroinflamación en la EA no es un sistema pasivo que comience a activarse a causa de las placas seniles y los ovillos neurofibrilares, sino que es un componente concurrente temporalmente con dichas lesiones (52). Esta neuroinflamación característicamente en las enfermedades degenerativas presenta una activación alterada de la microglía. Las células microgliales son las células inmunitarias que residen en el SNC y contribuyen tanto a la homeostasis cerebral como al mantenimiento de plasticidad de los circuitos neuronales, coadyuvando a la protección y remodelación de las sinapsis (53,54). Sin embargo, no son los únicos participantes del proceso neuroinflamatorio que acontece durante la EA: se ha visto y se está estudiando el papel que también tienen otros elementos como la astrogliá, y las citocinas inflamatorias y anti- inflamatorias, y se ha demostrado que la inflamación crónica mediada por receptores inflamatorios (IL-1R1, TLR4 y TNFR) es un mecanismo importante por el cual los depósitos de A β contribuyen al desarrollo de la patología tau y al deterioro cognitivo de la EA (55–57).

La asociación entre la neuroinflamación y neurodegeneración en la EA ha sido objeto de un intenso abordaje mediante un gran número de estudios neuropatológicos y neuropsiquiátricos (58). En este sentido, recientemente se ha demostrado que el proceso neurodegenerativo en la EA está acompañado de alteraciones en la neurogénesis en el hipocampo (17,18).

1.6. Diagnóstico

En la actualidad no disponemos de marcadores biológicos con la fiabilidad y especificidad necesarias. A pesar de ello los niveles tanto de proteína A β 1-42 como de la proteína tau en el líquido cefalorraquídeo (LCR) se han convertido en marcadores biológicos importantes de la patología relacionada con la EA (59), aunque el único diagnóstico definitivo se deriva del análisis neuropatológico *post mortem* (60–62).

Por otra parte, en la comunidad científica clínica existen unos criterios de diagnóstico que son generales de las demencias (63–65), así como otros específicos para EA (60). Aunque, como ya se ha comentado el diagnóstico definitivo se establece través de la neuropatología *post mortem*, estos criterios nos permiten diagnosticar como EA probable la demencia que haya cursado con un inicio insidioso y progresivo, siempre y cuando se descarten otras enfermedades sistémicas o cerebrales que puedan explicar dicha demencia.

1.7. Tratamiento

A pesar de todos los avances científicos y clínicos que se han desarrollado en estos últimos 30 años, en la actualidad el tratamiento disponible para la EA es solo sintomático, actuando en diferentes niveles del proceso neuropatológico (66). En cuanto a los tratamientos farmacológicos específicamente, en el mercado existen solo cuatro [4] fármacos aprobados para el tratamiento de la EA, que se pueden clasificar en dos grupos: i) los inhibidores de la acetilcolinesterasa (AChEI), que son el donepezilo, la rivastigmina y la galantamina, y ii) los antagonistas de los receptores de ácido N-metil-D-aspartico (NMDAR), en el que estaría incluida la memantina (66–68). Estos tratamientos, aunque pueden mejorar la calidad de vida de los pacientes, no detienen el curso de la enfermedad.

Sin embargo, se encuentran en diferentes fases de investigación nuevos tratamientos y estrategias terapéuticas dirigidos a múltiples dianas y diseñados para poder ser administrados de manera eficaz en las fases iniciales de la EA (dada la complejidad neuropatológica de la misma) (69), con lo que se postula una mejora en la calidad de vida y una ralentización del inicio de los síntomas en los pacientes con EA para la próxima década.

1.8. Enfermedad de Alzheimer, genética y factores de riesgo

Históricamente se habían podido identificar mutaciones de penetrancia total (causal) en tres genes que conducen a la EA familiar de inicio temprano: i) el gen de la APP en el cromosoma 21, y ii-iii) los dos genes de presenilina (PSEN1, en el cromosoma 14 y PSEN2, en el cromosoma 1), siendo el primero el locus más frecuentemente implicado en los casos de EA de inicio precoz (que supone el 70%) (5). La presenilina es una subunidad de la enzima gamma secretasa, cuya función principal es inducir la proteólisis de numerosa proteínas en la célula, por lo que mutaciones en este gen implicarían un déficit en la degradación de la APP.

Recientemente, las nuevas técnicas de mapeado genético nos han permitido identificar tres nuevos genes de riesgo CLU, PICALM1 y CR1 (70,71). Estos genes están relacionados con la eliminación de A β del cerebro (72,73), el procesamiento de la APP (74,75) y los aumentos en los depósitos de A β (76) respectivamente.

Como ya se ha comentado previamente, la neuroinflamación está claramente relacionada con la etiopatogénesis de la EA. En este sentido se han identificado variantes en al menos 16 genes implicados en funciones de microglia/macrófagos como riesgos para desarrollar EA (81). Entre

ellos, la presencia del alelo $\epsilon 4$ del gen APOE es un conocido factor de riesgo, que acelera la edad de aparición de la EA. La APOE es producida por microglía y astrocitos y regula no solo los lípidos y el metabolismo de A β sino también la quimiotaxis microglial y la expresión de citocinas proinflamatorias (82).

Estudios recientes también han sugerido que los eventos de la vida temprana (por ejemplo, infecciones intrauterinas, estrés materno y mala nutrición materna y perinatal) pueden jugar cierto papel en la aparición de la EA (83). Desde esta perspectiva, es probable que la EA no esté determinada por un único factor etiológico, sino como resultado de la interacción entre factores genéticos y ambientales a lo largo de la vida.

Es por ello por lo que en los últimos años, se ha intentado establecer la relación de la EA con otras comorbilidades. La mayoría de los pacientes con EA son sujetos mayores que sufren ciertas comorbilidades (como diabetes, estrés, osteoporosis, enfermedad renal, obesidad, hipertensión e hipercolesterolemia/dislipidemia, o han sufrido algún accidente cerebrovascular o convulsiones) y éstas parecen afectar tanto al inicio como a la progresión de la EA, lo que agrega complejidad al estudio de la patogénesis de la enfermedad (84,85). Los mecanismos que subyacen a esta relación son variados y complejos, entre ellos se incluye la resistencia a la insulina, la inflamación, la disfunción endotelial y el estrés oxidativo.

De las comorbilidades nombradas, una de las condiciones más prevalentes es la diabetes; estudios epidemiológicos recientes indican que la diabetes aumenta significativamente el riesgo de desarrollar EA, lo que sugiere que la diabetes puede tener un papel causal en el desarrollo de la patogénesis de la misma (86). Además, la EA y la diabetes comparten varias características clínicas y bioquímicas, lo que sugiere vías moleculares comunes subyacentes a estas dos enfermedades (87–90).

También se ha estudiado la relación entre la EA y el sexo al nacer. Aunque la prevalencia de EA es mayor en las mujeres, la incidencia, que a menudo se considera una medida más fiable, no parece ser significativamente diferente. En todo caso, se ha visto tanto que los bajos niveles de testosterona son un factor de riesgo para padecer la EA como que los hombres que están genéticamente predispuestos a sufrir la EA presentan niveles bajos de testosterona (91). Además, se postula que las gonadotropinas pueden influir en la progresión de la patología de la EA ya que estas hormonas sexuales pueden cruzar la barrera hematoencefálica y existe una alta densidad de receptores de gonadotropinas en el hipocampo (92–94). En particular, hay un aumento significativo de la hormona luteinizante en el citoplasma de las neuronas piramidales y los ovillos neurofibrilares de los cerebros con EA en comparación con los controles de la

misma edad (95). Aunque es posible que haya una influencia de las gonadotropinas en la patología de la EA, la relación directa aún no se ha dilucidado.

1.9. Correlación anatomopatológica en la enfermedad de Alzheimer

En cuanto a la correlación clínico-patológica, la mayoría de las investigaciones sobre la EA se han centrado especialmente en la correlación entre las características moleculares y neuropatológicas de la enfermedad y los déficits cognitivos característicos asociados con el trastorno (96).

Como ya se ha nombrado, la aparición de las alteraciones neuropatológicas sigue una evolución típica, que va progresando desde las primeras capas de la corteza entorrinal, que son las primeras neuronas corticales que manifiestan los cambios, el hipocampo y amígdala, hasta la destrucción severa de las áreas asociativas neocorticales, principalmente en las áreas temporal y fronto-parietal (16); sin embargo, éstas pueden o no relacionarse con el deterioro cognitivo y las demás alteraciones.

Se ha visto que la memoria y el deterioro cognitivo observado en pacientes con EA se correlaciona mejor con la disfunción sináptica que con la presencia de SP y/o NFT y por eso, la disfunción sináptica es probablemente el factor más importante que contribuye a las etapas iniciales de la pérdida de memoria (97–101), pero es cierto que la manifestación más temprana y más prominente de la EA es la deposición de NFT en subestructuras del lóbulo temporal medial, incluyendo el córtex entorrinal, hipocampo, giro parahipocampal, amígdala y córtex cingulado (16). También se ha visto que aunque A β puede desempeñar un papel clave en la patogénesis de la EA, la gravedad del deterioro cognitivo se correlaciona mejor con la presencia de NFT corticales (102).

Aunque los déficits cognitivos de la EA son fundamentales, los síntomas no cognitivos son cada vez más importantes debido a su prevalencia y las disfunciones que generan. Los síntomas psicológicos y de conducta incluyen comportamiento motor anormal, depresión, miedo, ansiedad y trastornos de personalidad (como agresión e irritabilidad) (96). El hipocampo y la corteza entorrinal así como también la amígdala presentan una disminución de volumen y se sabe que estas estructuras, especialmente la amígdala y la corteza orbitofrontal están relacionadas con el procesamiento de la memoria emocional (103). Sin embargo, es necesario profundizar más en el estudio de estos síntomas ya que no han sido caracterizados de forma evidente, y serán el objeto final del estudio que nosotros hemos comenzado.

1.10. Modelos animales para la enfermedad de Alzheimer

Los modelos murinos son modelos muy útiles en la EA, ya que reproducen aspectos de la enfermedad, a menudo a través de mutaciones genéticas asociadas con EA familiar, y pueden ayudar a esclarecer su patogénesis. Aunque la EA familiar es menos común, los fenotipos patológicos son similares a la EA esporádica (104). Muchos de los modelos de ratón, por lo tanto, se han basado por lo tanto en alguna de las tres mutaciones genéticas anteriormente nombradas.

La línea de ratón 3xTgAD fue desarrollada por Oddo y cols. (38) quien generó un modelo triple transgénico mediante la coinyección de dos transgenes que contenían mutaciones en el gen de la APP y de tau a ratones que presentaban una mutación en el gen de la presinilina. Esta triple mutación transgénica que expresa APP, PS1 y Tau contiene placas A β y ovillos neurofibrilares, a diferencia de la mayoría de los ratones transgénicos con una o dos mutaciones, que se asemejan a casos de EA más raros, con depósitos de amiloide y tau hiperfosforilada pero sin ovillos neurofibrilares (105). En este modelo se observa un déficit cognitivo temprano relacionado con los depósitos de A β intraneuronal, por lo que es un modelo que permite investigar el desarrollo y el tratamiento de la neurodegeneración en la EA en diferentes estadios (106,107).

También se ha utilizado este modelo animal para comprender el impacto de estas condiciones médicas comórbidas en la patogénesis de la EA (108), así como para estudiar las diferentes terapias potenciales para su tratamiento (107,109)

Como correlaciones anatomopatológicas se ha observado en estos ratones la presencia de SP presentes a los 3 meses de edad, y de NFT a los 12 meses de edad en el hipocampo y la corteza entorrinal, aunque el desarrollo de la patología tau comienza a los 6 meses (38,110).

Estos ratones también tienen una función sináptica alterada que progresa con la edad y alteraciones de la memoria y el comportamiento (111,112).

1.11. Objetivos del presente trabajo

a. Evaluar si en el modelo transgénico de EA 3xTgAD las hembras de 3 meses de edad presentan una mayor respuesta ansiogénica frente a los controles, estimada mediante dos test diferentes (el test de campo abierto y el test del laberinto elevado).

- b. Evaluar la posible existencia de un deterioro cognitivo temprano en el modelo transgénico de EA 3xTgAD en hembras de 3 meses de edad, estimada mediante el test de reconocimiento de objetos nuevos (NOR).
- c. Estimar la posible correlación entre la respuesta a la ansiedad y la afectación cognitiva en las hembras 3xTgAD frente a las hembras control apareadas.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Animales empleados

Para este trabajo hemos empleado ratones mutantes triple transgénico (3xTg-AD) para la enfermedad de Alzheimer B6;129-Psen1tm1Mpm Tg(APP^{Swe},tauP301L)^{1Lfa}/Mmjax (Jackson laboratory: MMRRRC Stock No: 34830-JAX) y ratones con genotipo salvaje B6129SF2/J (Jackson laboratory: MMRRRC Stock No: 101045). Toda la investigación fue aprobada por el Comité Ético de la Universitat Jaume I de Castellón.

Para nuestro estudio hemos empleado 3 ratones hembra 3xTg-AD y 3 ratones hembra B6129SF2, que han sido criadas en el animalario de la Universitat Jaume I de Castellón a partir de dos parejas de padres y madres adquiridos comercialmente (Jackson Laboratories). Los ratones se alojaron en una sala mantenida a 22 ± 2 ° C con un ciclo 12:12 luz: oscuridad (L:D).

Los ratones fueron destetados a los 21 días de edad y alojados en grupos de 2-4 compañeros de camada en jaulas de plástico (18,75 cm x 28 cm x 12,5 cm), con un tubo de PVC (4 cm de diámetro x 7 cm de longitud) para el enriquecimiento. Se les proporcionó comida y agua *ad libitum*. Cuando se precise los ratones serán genotipados usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de muestras de tejido obtenidas por punción de oído (*no realizado en el presente trabajo*).

En ambos grupos las pruebas se han realizado a los 3 meses de vida de las ratonas.

2.2. Pruebas de comportamiento realizadas

Todas las pruebas se ordenaron de menos a más estresante para disminuir el efecto del estrés en el aprendizaje y la memoria.

Todos los experimentos conductuales se llevaron a cabo en una sala experimental en la que se minimizó la interferencia de sonidos externos y presentaban un flujo de aire regulado. Los animales se habituaron a la sala durante al menos 30 minutos antes de cada prueba, evitándose cualquier estrés ambiental o físico que pudiese alterar el resultado de las pruebas. Todos los aparatos utilizados se limpiaron minuciosamente después de cada sesión de ensayo con una solución al 30% de etanol.

2.2.1. Test de laberinto elevado

La prueba del laberinto elevado es un paradigma validado para evaluar el comportamiento asociado con la ansiedad en roedores (113). De igual manera proporciona medidas simultáneas de locomoción y exploración. Se empleó un protocolo validado previamente y adaptado de estudios previos (114,115).

El laberinto elevado utilizado en este trabajo está construido en plexiglás y consta de cuatro brazos y una plataforma central. Dos de los brazos son abiertos (45x5 cm) presentando bordes de 0.25 cm para evitar que el roedor se pueda caer durante el procedimiento. Los otros dos brazos (45x5 cm) están cerrados con paredes de 40 cm. El tamaño de la plataforma central es de 5x5 cm. El suelo del laberinto está hecho de plexiglás negro mientras que los bordes están elaborados en plexiglás transparente. El laberinto está elevado 45 cm sobre el suelo (114) (Figura 1).

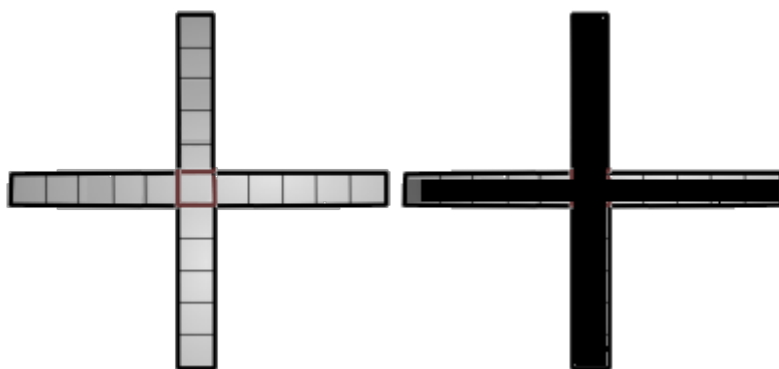


Figura 1. Imagen vista desde arriba del aparato de laberinto elevado

En este test la tendencia de los ratones a explorar entornos nuevos se contrarresta con la ansiedad relacionada con la exposición (brazo abierto) y la elevación del test.

Tras la habituación a la sala los ratones se colocaron sobre la plataforma central frente a un brazo cerrado, elegido aleatoriamente y se les permitió explorar el aparato durante 5 minutos (114,115) para posteriormente ser retornados a sus jaulas de origen. Todas las pruebas se realizaron bajo iluminación tenue para controlar el estrés debido a la exposición a la luz. Entre las sesiones de prueba de los diferentes animales, el aparato se limpió a fondo con etanol 30%. El comportamiento en el aparato fue grabado en video usando una videocámara (Sony, Canadá) y analizado por un observador ciego, que desconocía las condiciones experimentales, en una computadora de PC mediante el programa Smart 2.5.19. Para fines de puntuación, se anotó una entrada de brazo cuando las cuatro patas más la base de la cola pasaron el umbral del brazo. Cuantificamos el número total de entradas en brazos abiertos y cerrados, así como

la cantidad de tiempo invertido en estas áreas del aparato de prueba. De igual manera se evaluó el número de veces que el animal sumergía la cabeza en los brazos abiertos (explorando los lados del laberinto hacia el suelo) (114)

2.2.2. Test de campo abierto

Los roedores muestran una aversión natural a las áreas abiertas iluminadas. Sin embargo, también tienen un impulso para explorar un estímulo amenazante percibido. La disminución de los niveles de ansiedad conduce a un mayor comportamiento exploratorio. El aumento de la ansiedad dará como resultado una menor locomoción y una preferencia para permanecer cerca de las paredes del campo (thigmotaxis). Se empleó un protocolo adaptado de referencias previas (114–116).

El test de campo abierto está fabricado en conglomerado de madera pintado en color blanco y posee unas medidas de 72x72 cm. El test está dividido en 16 cuadrados de tamaño 18x18 cm mediante líneas negras (114). El centro del campo abierto posee un cuadrado central de 36x36 cm resaltado en color rojo (Figura 2).

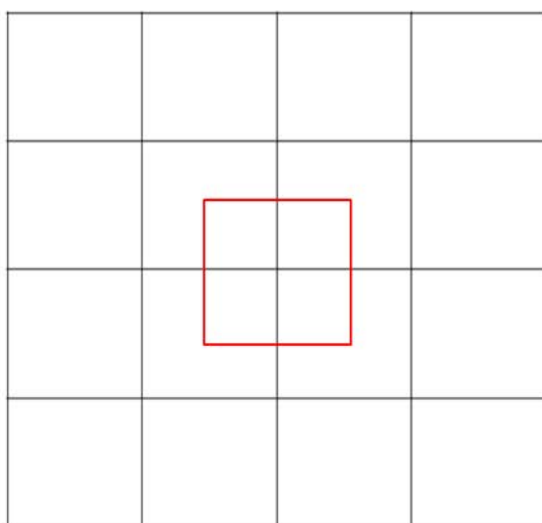


Figura 2. Imagen vista desde arriba del aparato donde se ha realizado la prueba de campo abierto

Al comienzo de la prueba, el animal se colocó en el centro del test y se les permitió explorar libremente el laberinto durante cinco minutos.

Se evaluaron los siguientes parámetros:

- Número de cruces de línea: número de veces que el ratón cruza con las cuatro patas alguna de las líneas negras de los cuadrados del suelo.
- Número de entradas en el cuadrado central: número de veces que el ratón cruza con las cuatro patas alguna de las líneas rojas del cuadrado central
- Tiempo en el cuadrado central: tiempo que el ratón pasa en el cuadro central
- Elevaciones: número de veces que el ratón se levanta apoyando las patas delanteras en las paredes del aparato.
- Posturas de estiramiento: número de veces que el ratón estira la cabeza y cuello, seguidas de la retracción a la posición original.
- Aseo: tiempo que el animal pasa lamiéndose o rascándose mientras se encuentra parado
- Micción: número de charcos de orina
- Defecación: número de heces fecales del ratón

Tras la realización de la prueba el animal fue devuelto a su jaula y a semejanza del experimento anterior su desempeño en el test de campo abierto fue grabado en video usando una videocámara (Sony, Canadá) y analizado por un observador ciego, que desconocía las condiciones experimentales, en una computadora de PC mediante el programa Smart 2.5.19 (115).

2.2.3. Test de reconocimiento de objetos.

En los humanos a menudo se accede a la memoria a través del lenguaje hablado o escrito, mientras que, en los animales, se debe acceder a las funciones cognitivas a través de diferentes tipos de comportamiento específicos de memoria y aprendizaje. Entre ellos, la prueba de reconocimiento de objetos novedosos puede evaluarse por las diferencias en el tiempo de exploración de objetos nuevos y familiares. El protocolo empleado fue adaptado de referencias previas (114,115,117).

El suelo del aparato de campo abierto está hecho de madera pintada en color blanco, y sus medidas son de 72x72. Está dividido en 16 cuadrados de 18x18 cm mediante líneas negras. (114). El cuadrado central que queda limitado a partir de los cuadrados internos (18x18 cm) fue resaltado en color rojo (imagen 2).

Los animales fueron habituados al aparato (sin exponerlos a los objetos) durante 10 minutos, en 2 días consecutivos (117). Posteriormente se realizaron dos ensayos .

a. Primer ensayo: familiarización

Después de los dos días de habituación, se comenzó con la primera prueba. En ella, se colocaron dos objetos iguales (O1 y O2) en esquinas contiguas situadas en los cruces de líneas de los cuadrados de las esquinas superiores. El ratón se colocó en el centro del aparato y se soltó para explorar la caja y los objetos durante 10 minutos.

b. Segundo ensayo: prueba

Después de un intervalo de 30 minutos, el ratón que había realizado el primer ensayo se reintrodujo en la caja, que ahora contenía uno de los objetos familiares de la prueba anterior (O2) en la misma posición y uno nuevo (O3), de tamaño similar, que reemplazaba a otro de los objetos (O1). El ratón se colocó en el centro del aparato y se soltó para explorar la caja y los objetos durante 10 minutos (115).

La disposición de los objetos se puede ver en la figura 3.

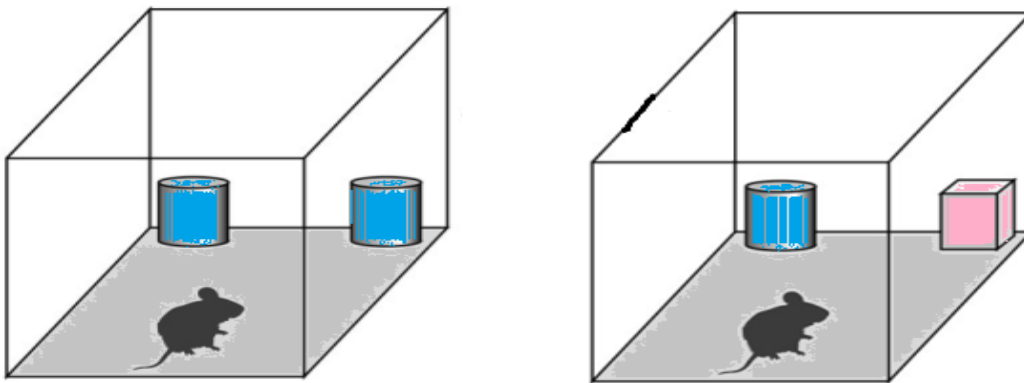


Figura 3. Disposición de los objetos en la fase de familiarización (objetos iguales, imagen de la izquierda) y en la fase de prueba (objetos diferentes, imagen de la derecha).

Se realizó contrabalanceo con los objetos con cada uno de los animales.

Se registraron las siguientes conductas (114) :

- Número de cruces de línea: número de veces que el ratón cruza con las cuatro patas alguna de las líneas negras de los cuadrados del suelo.
- Número de entradas en el cuadrado central: número de veces que el ratón cruza con las cuatro patas alguna de las líneas rojas del cuadrado central
- Tiempo en el cuadrado central: tiempo que el ratón pasa en el cuadro central
- Tiempo que pasa con cada uno de los objetos (olfateando, trepando o cerca del objeto) de ambas pruebas
- Estiramiento hacia los objetos: número de veces que se acerca y se estira hacia cada objeto seguida de la retracción a la posición original.

- Elevaciones: número de veces que el ratón se levanta apoyando las patas delanteras en las paredes del aparato
- Posturas de estiramiento: número de veces que el ratón estira la cabeza y cuello, seguidas de la retracción a la posición original.
- Aseo: tiempo que el animal pasa lamiéndose o rascándose mientras estaba parado

A partir de estos datos obtendremos también el índice de discriminación. Este se calcula restando el tiempo transcurrido con el objeto nuevo (TN) al tiempo transcurrido explorando el objeto familiar (TF), y dividido entre el tiempo explorando objetos nuevos y familiares: $(TN - TF) / (TN + TF)$.

2.3. Análisis estadístico

Todos los análisis fueron realizados por un observador cegado a las condiciones experimentales de las muestras. Aunque el tamaño de la muestra obtenida era muy bajo, realizamos una simulación de análisis estadístico. Para ello realizamos el test de normalidad de Shapiro-Wilk a nuestras poblaciones muestrales. En los grupos que cumplían criterios de normalidad las diferencias significativas se determinaron empleando la prueba t de Student. En aquellos grupos que no seguían un criterio de normalidad se aplicó el test no paramétrico U de Mann-Whitney. La probabilidad significativa establecida fue $\alpha < 0.05$. Los análisis estadísticos y representaciones gráficas fueron realizados con el software GraphPad Prism V7 (GraphPad, La Jolla, CA, EE. UU.).

3. RESULTADOS:

3.1 Test de laberinto elevado:

En la prueba de laberinto elevado se emplearon 3 ratones hembra 3xTg-AD y 3 ratones hembra control, y se cuantificó durante 5 minutos el número de entradas y el tiempo transcurrido tanto en los brazos abiertos como en los brazos cerrados, así como el tiempo transcurrido en el centro del laberinto (Figura 4).

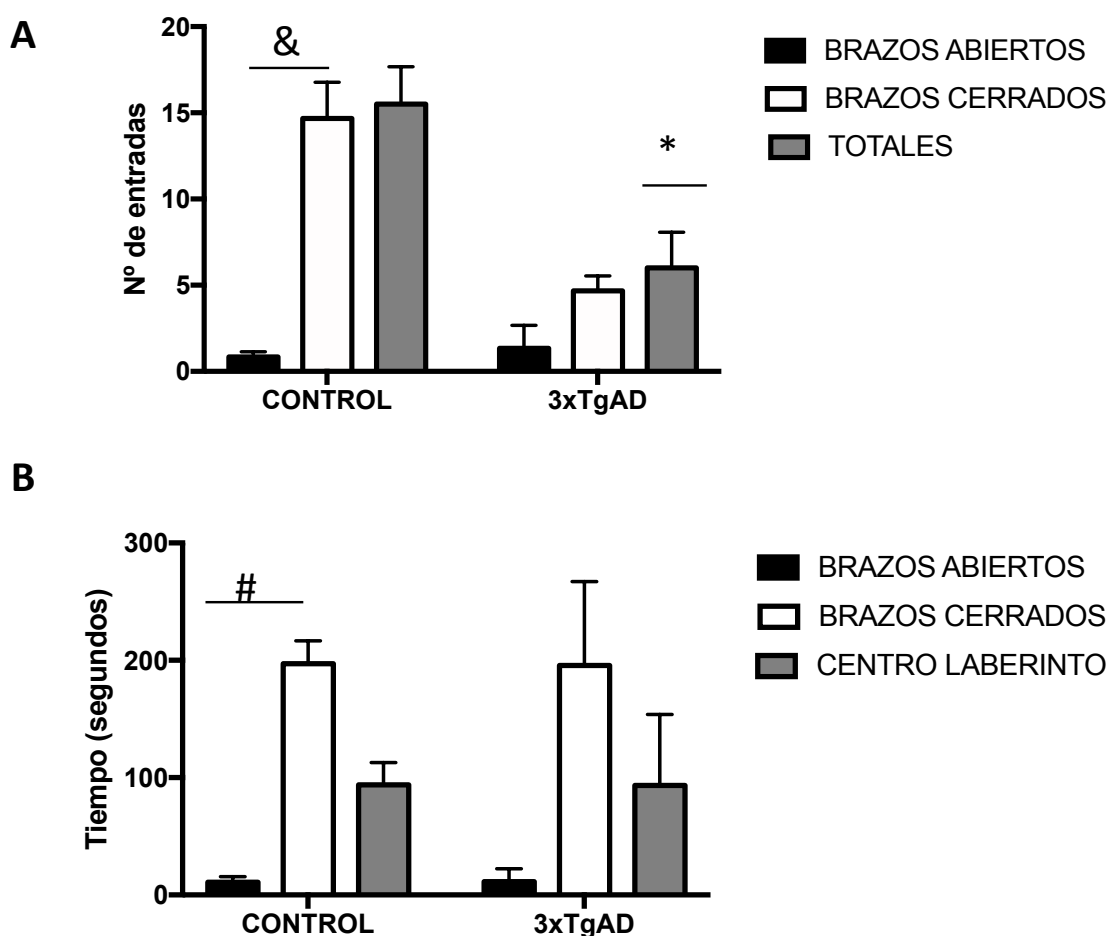


Figura 4. Número de entradas y tiempo empleado en la prueba del laberinto elevado. Resultados de la prueba de laberinto elevado obtenidos en ratonas 3xTgAD (n=3) y controles (n=3). Se evaluó el número de entradas en brazos abiertos y cerrados y total de entradas (A), así como tiempo transcurrido en cada parte del laberinto (B). *p < 0.05 (diferencias en el número de entradas entre animales controles vs 3xTgAD); &p < 0.005 (diferencias en el número de entradas en brazos abiertos vs brazos cerrados en animales control); # p < 0.005 (diferencias en el tiempo transcurrido en brazos abiertos vs brazos cerrados en animales control). Para el análisis estadístico se realizó el test no paramétrico de la prueba U de Mann-Whitney.

Realizamos dos tipos de abordaje estadístico, por un lado analizamos si existían diferencias intergrupos (comparando los datos obtenidos en animales control vs los datos obtenidos en los animales 3xTgAD) y por otra parte evaluamos las diferencias existentes intragrupos (si existían diferencias dentro del grupo control y dentro del grupo transgénico en cuanto a la preferencia por los brazos visitados).

En el análisis del primer abordaje, que evaluaba las diferencias entre controles y transgénicos se observó que no había diferencias significativas entre el número de entradas en brazos abiertos y/o cerrados entre los animales 3xTgAD comparados con los controles. Sí hay una diferencia significativa entre los ratones control vs 3xTgAD en el número de entradas totales ($P < 0.05$, representada por *) (Figura 4A). Por otra parte, el análisis de los datos del tiempo transcurrido en brazos abiertos y en brazos cerrados como el transcurrido en el centro del laberinto no mostró diferencias significativas al comparar el grupo transgénico con el control (Figura 4B).

En el segundo análisis en el que dilucidamos si existían diferencias significativas en la preferencia de los brazos dentro de cada grupo se observó un aumento significativo en el número de entradas en brazos cerrados frente al número de entradas en brazos abiertos en los animales control ($p = 0.002$, representado por &). En los animales 3xTgAD existe una tendencia a entrar más en los brazos cerrados que en los brazos abiertos cerrados, aunque no es estadísticamente significativa (ver tabla 1 y figura 4A). Por otra parte se observó un aumento significativo en el tiempo transcurrido en brazos cerrados frente al tiempo transcurrido en brazos abiertos en los animales control ($p = 0.002$, representado por #). En los animales 3xTgAD existe una tendencia a permanecer más en los brazos abiertos que en los cerrados, aunque no es estadísticamente significativa (ver tabla 1 y figura 4B).

También realizamos una comparativa de la influencia del lugar en el tiempo transcurrido (comparamos brazos abiertos, cerrados y centro del laberinto mediante un test no paramétrico de Kruskal-Wallis). Se observó una interacción del lugar preferido en el tiempo que el animal pasa en él tanto en los animales control (KF: 13,53 ; $p < 0,0001$) como en los animales transgénicos (KF: 5,73 ; $p = 0,03$) (*datos no representados*).

Finalmente, para completar nuestro estudio sobre los parámetros de ansiedad evaluables en el test del laberinto elevado cuantificamos el número de veces que los ratones sumergían la cabeza en los brazos abiertos del laberinto (Figura 5).

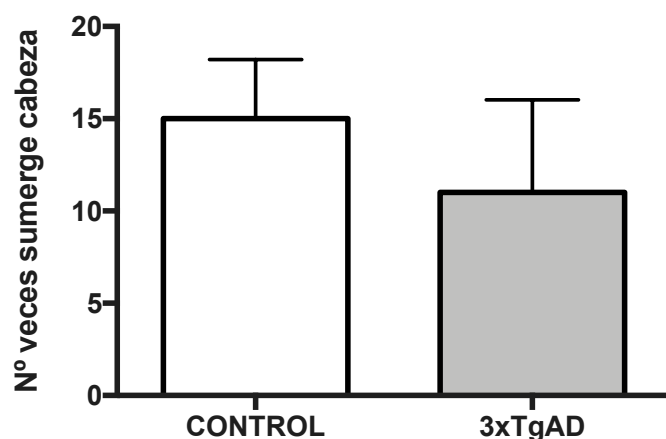


Figura 5. Evaluación del nº de veces que el animal sumerge la cabeza en el brazo abierto del laberinto elevado. Se representan los resultados de la prueba de laberinto elevado obtenidos en ratonas 3xTgAD (n=3) y controles (n=3). El análisis estadístico empleando el test de Mann-Whitney no mostró resultados significativos ($p > 0.05$) entre ambos grupos

El análisis de los resultados de la figura 5. muestran una tendencia a un mayor número de veces que sumergen la cabeza los ratones control frente a los animales transgénicos, sin llegar tampoco a existir una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos (ver tabla 1).

Test de laberinto elevado	Significación (p)
Número entradas brazos abiertos entre grupos (control vs 3xTgAD)	0,860
Número entradas brazos cerrados entre grupos (control vs 3xTgAD)	0,060
Número total de entradas entre grupos (control vs 3xTgAD)	0,040
Diferencias entradas brazo abierto vs brazo cerrado (grupo control)	0,002
Diferencias entradas brazo abierto vs brazo cerrado (grupo 3xTgAD)	0,200
Tiempo en brazos abiertos entre grupos (control vs 3xTgAD)	0,860
Tiempo en brazos cerrados entre grupos (control vs 3xTgAD)	0,710
Tiempo en el centro entre grupos (control vs 3xTgAD)	0,900
Tiempo empleado brazo abierto vs brazo cerrado (grupo control)	0,002
Tiempo empleado brazo abierto vs brazo cerrado (grupo 3xTgAD)	0,100
Sumerge la cabeza entre grupos (control vs 3xTgAD)	0,670

Tabla 1. Resumen de la significación de los diferentes parámetros evaluados en el test del laberinto elevado.

3.2 Test de campo abierto:

En la prueba de campo abierto se emplearon 3 ratones hembra 3xTg-AD y 3 ratones hembra control. Durante un tiempo de 5 minutos se cuantificó el cruce de líneas, las entradas y la permanencia del animal en el cuadro central (figura 3).

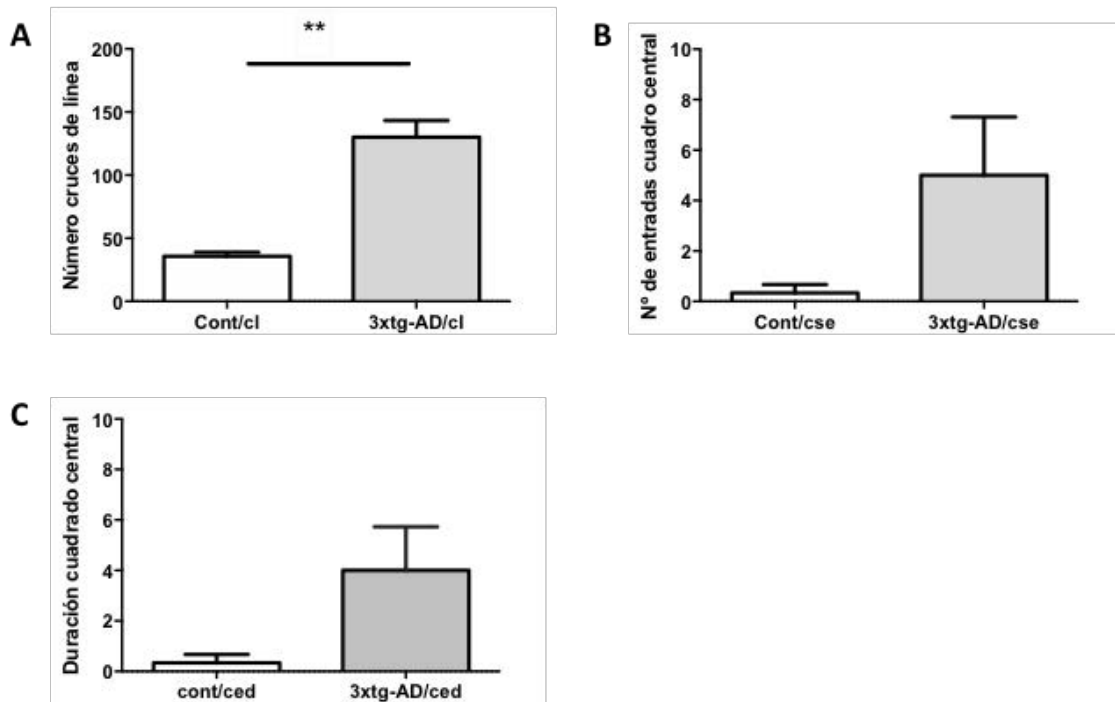


Figura 3. Número de cruces de línea y de entradas en el cuadro central en la prueba de campo abierto. Se evaluaron el número de cruces de línea (A) y el número de entradas en cuadrado central (B) de ratonas 3xTgAD (n=3) y controles (n=3). El análisis de los resultados mostró un aumento significativo en el número de cruces de línea de los animales transgénicos frente a los controles (**p< 0.01) no así para el número de entradas en el cuadro central. Para el análisis estadístico se realizó el test no paramétrico de la prueba U de Mann-Whitney), excepto el número de cruces de líneas, que al seguir una distribución normal, aplicamos la el test de t-student .

Como puede observarse, el número de cruces de línea es significativamente superior en los ratones 3xTgAD respecto al grupo de control (p<0,01).

También el número de entradas en el cuadrado central y el tiempo transcurrido en el cuadrado central presenta una tendencia a ser superior en los ratones 3xTgAD, pero sin llegar a ser significativo.

Durante este tiempo también se midió el tiempo que los ratones sufrían procesos de freezing o congelación, y de cuidado personal (acicalamiento) (figura 4).

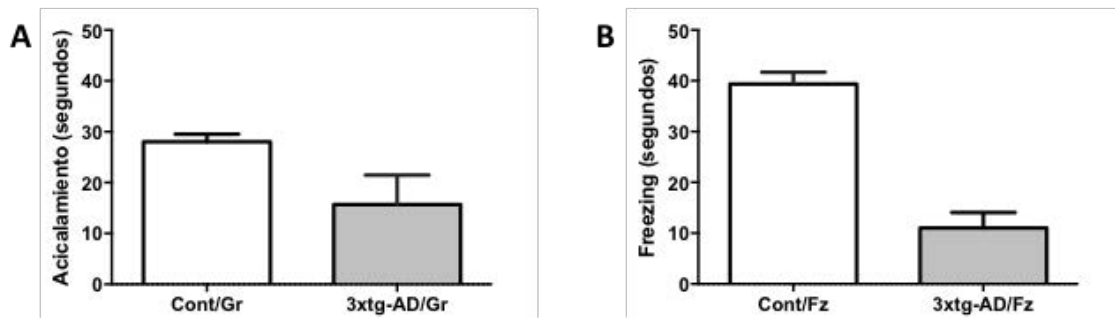


Figura 4. Medida de los procesos de congelación (freezing) y de acicalamiento en el test de campo abierto. Se evaluaron el tiempo destinado a conductas de acicalamiento (A) y el tiempo que el animal se encontraba en congelación (B) de ratonas 3xTgAD (n=3) y controles (n=3). El análisis de los resultados no mostró diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los animales 3xTgAD frente a los controles. Para el análisis estadístico se realizó el test no paramétrico de la prueba U de Mann-Whitney).

Tanto el tiempo de congelación o "freezing" como el tiempo que los ratones estuvieron acicalándose mostraba una tendencia superior en los animales control al compararlos con los animales transgénicos, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas.

Por último se contabilizaron dos medidas más relacionadas con la ansiedad como el número de estiramientos y de veces que los animales se alzaban en el test de campo abierto (figura 5).

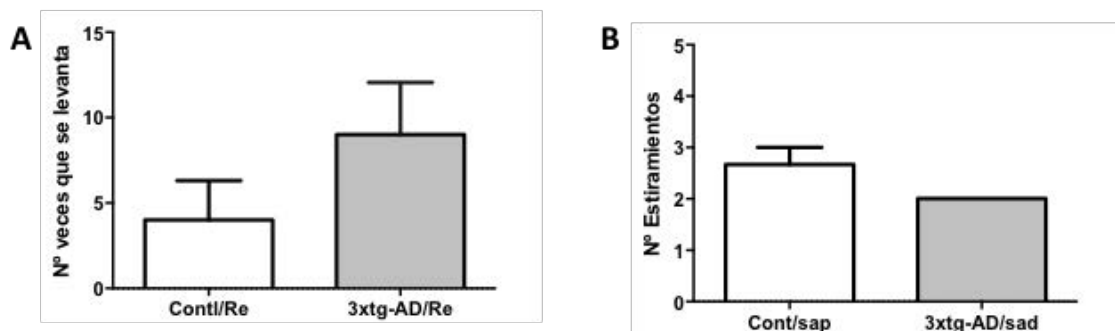


Figura 5. Número de veces que el animal se alzaba o se estiraba durante la prueba de campo abierto. Se evaluaron el número de veces que el animal se elevaba o levantaba (A) y el número de estiramientos (B) de ratonas 3xTgAD (n=3) y controles (n=3). El análisis de los resultados no mostró diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los animales 3xTgAD frente a los controles. Para el análisis estadístico se realizó el test no paramétrico de la prueba U de Mann-Whitney).

Al igual que en la figura 4, el análisis tanto del número de veces que el animal se levantaba como el número de estiramientos mostraba una tendencia superior en los animales control al compararlos con los animales transgénicos, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas (ver tabla 2).

Por último, al finalizar la prueba se contaron el número de deposiciones fecales y de deposiciones urinarias que cada ratón había hecho durante la prueba (figura 6)

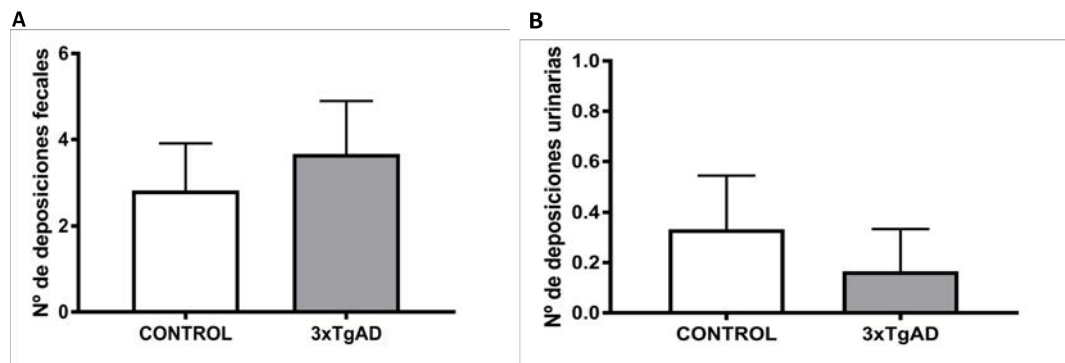


Figura 6. Número de defecaciones y de deposiciones urinarias durante la prueba de campo abierto. Se evaluaron el número de veces que el animal defecó (A) y el número de deposiciones urinarias (B) de ratonas 3xTgAD (n=3) y controles (n=3). El análisis de los resultados no mostró diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los animales 3xTgAD frente a los controles. El análisis estadístico del número de defecaciones, al seguir una distribución normal, aplicamos el test de t-student.; mientras que para el número de deposiciones urinarias se realizó el test no paramétrico de la prueba U de Mann-Whitney).

El análisis de las deposiciones urinarias y fecales es un síntoma de ansiedad en el caso de que exista un aumento frente al grupo control. En nuestros resultados no obtuvimos diferencias significativas entre los grupos aunque existe una tendencia a un mayor número de deposiciones en los animales 3xTgAD frente a los controles, aunque no fue estadísticamente significativo ($p = 0,6$) (ver tabla 2).

Test de campo abierto	Significación (p)
Cruce de líneas	0,002
Entradas cuadrado central	0,200
Tiempo en cuadrado central	0,200
Estiramientos	0,400
Levantarse	0,400
Acicalamiento	0,200
Freezing	0,100
Defecación	0,600
Orina	1,000

Tabla 2. Resumen de la significación de los diferentes parámetros evaluados en la prueba de campo abierto

3.3 Resultados del test de reconocimiento de objetos novedosos (NOR)

Mediante esta prueba evaluaremos la posible existencia de disfunciones cognitivas en la realización de un test de memoria en las ratonas de 3 meses de edad. Brevemente recordaremos que la prueba constaba de dos fases: i) familiarización y ii) test.

Durante la fase de familiarización se contabilizó el comportamiento de cada uno de los animales frente a dos objetos novedosos. A lo largo de 10 minutos se contabilizó en la fase de familiarización o prueba (es decir, con objetos iguales) el número de veces que se acercaban a cada objeto y el tiempo transcurrido al lado de cada objeto (figura 6).

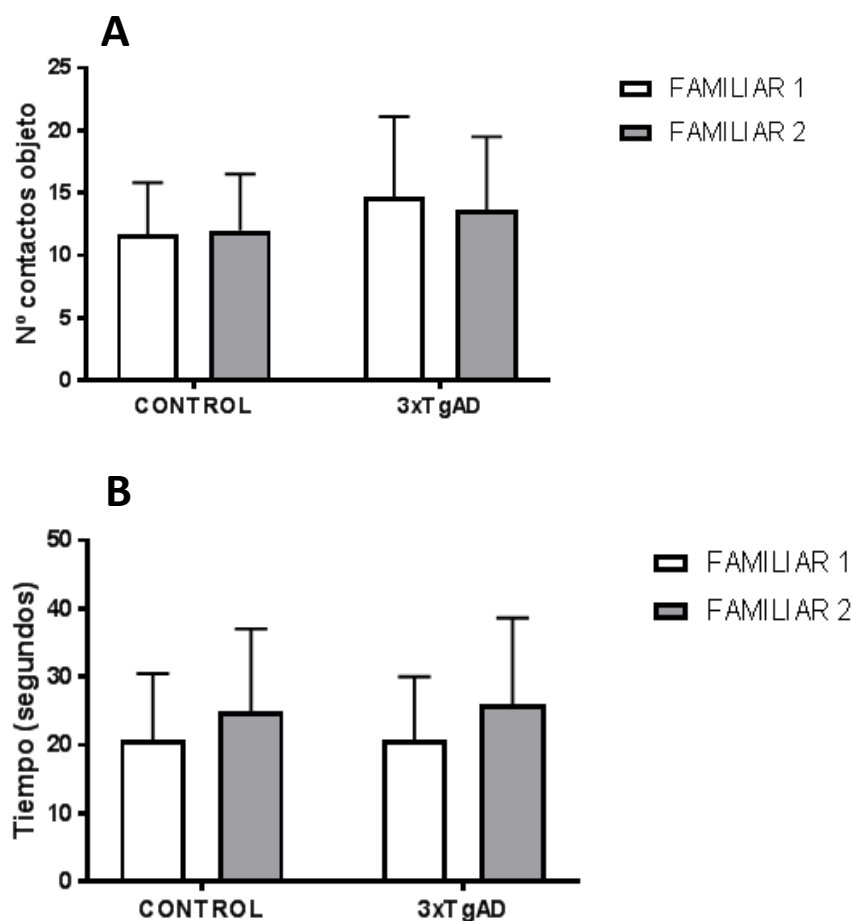


Figura 7. Resultados de la fase de familiarización en la tarea de reconocimiento de objetos novedosos (NOR). En la gráfica se representan el número de contactos con cada uno de los objetos (familiar 1 y familiar 2) por parte de los ratones transgénicos y controles (A), y el tiempo que interaccionaban con ellos (B). El análisis de los resultados no mostró diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los animales 3xTgAD frente a los controles. Para el análisis estadístico se realizó el test no paramétrico de la prueba U de Mann-Whitney).

Los resultados muestran como ambos grupos interaccionan por igual durante la fase de familiarización con cada uno de los objetos, que se refleja en un similar número de

aproximaciones y tiempo transcurrido cerca de cada uno de los objetos por parte de cada uno de los grupos, por lo que no presentan preferencia por ninguno de ellos ($p > 0.05$).

Posteriormente, transcurrida media hora se midieron los mismos parámetros durante 10 minutos en la fase de test o prueba, en la cual se sustituye uno de los objetos conocidos por otro novedoso (figura 7).

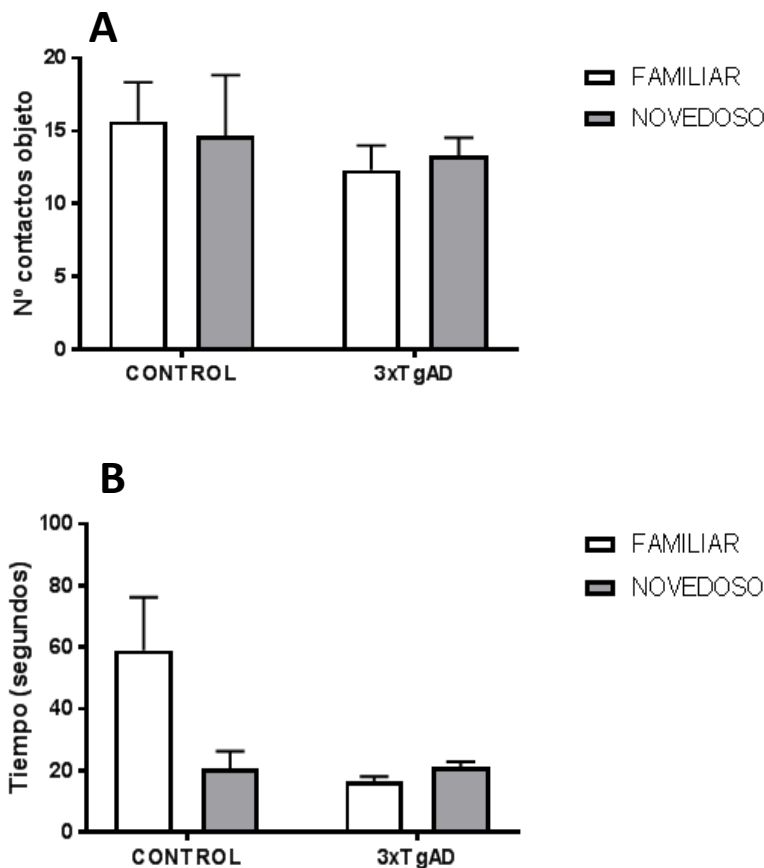


Figura 8. Resultados de la fase de test en la tarea de reconocimiento de objetos novedosos (NOR). En la gráfica se representan el número de contactos con cada uno de los objetos (familiar 1 y novedoso) por parte de los ratones transgénicos y controles (A), y el tiempo que interaccionaban con ellos (B). El análisis de los resultados no mostró diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los animales 3xTgAD frente a los controles. Para el análisis estadístico del número de contactos con objeto se realizó el test no paramétrico de la prueba U de Mann-Whitney, mientras que el análisis estadístico del tiempo cerca de los objetos, aplicamos la el test de t-student, ya que seguía una distribución normal.

En relación con la prueba de test en la que se le presentaba un objeto con el que ya habían interactuado antes (familiar) y otro novedoso, también el número aproximaciones al objeto novedoso es muy similar al número de aproximaciones al objeto familiar, por lo que no parece existir una predisposición a acercarse más al objeto novedoso en ninguno de los dos grupos de ratones. Sin embargo, en relación el tiempo transcurrido cerca de cada objeto sí encontramos

diferencias en el grupo control, que al contrario de lo esperado pasa más tiempo cerca del objeto ya conocido, aunque no llega a ser significativo ($p=0,06$). Por su parte, en el grupo de ratones transgénicos es lo contrario, es decir, pasan más tiempo cerca del novedoso, aunque esta diferencia no es significativa, ($p=0,1$).

A partir de estos resultados, se investigó la preferencia de los ratones por los objetos calculando el índice de discriminación. Este se obtiene restando el tiempo transcurrido con el objeto familiar al tiempo transcurrido explorando el objeto nuevo, y dividido entre el tiempo explorando objetos nuevos y familiares $(TN-TF)/(TN+TF)$ (figura 8).

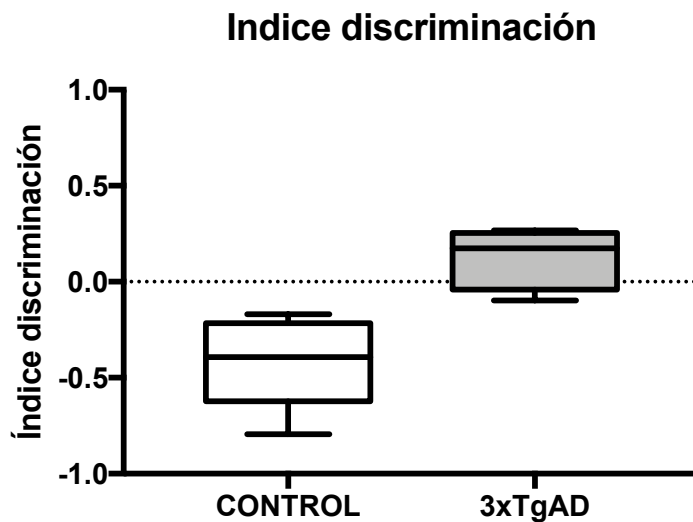


Figura 8. Índice de discriminación de objetos. Se obtiene restando el tiempo transcurrido con el objeto familiar del tiempo transcurrido explorando el objeto nuevo, y dividido entre el tiempo explorando objetos nuevos y familiares. Cuando el resultado se acerca a 1, indica que el ratón tiene preferencia por el objeto novedoso, mientras que si se acerca a -1, que prefiere el conocido.

Este resultado concuerda con lo visto anteriormente, es decir, indica una menor preferencia por el objeto nuevo por parte de los ratones control, y una ligera preferencia de los transgénicos por el novedoso.

Finalmente contabilizamos el número de cruces de línea y el tiempo que las ratonas pasaban acicalándose, así como el número de estiramientos y el número de veces que se levantaron tanto en la fase de familiarización como en la de prueba (figura 9).

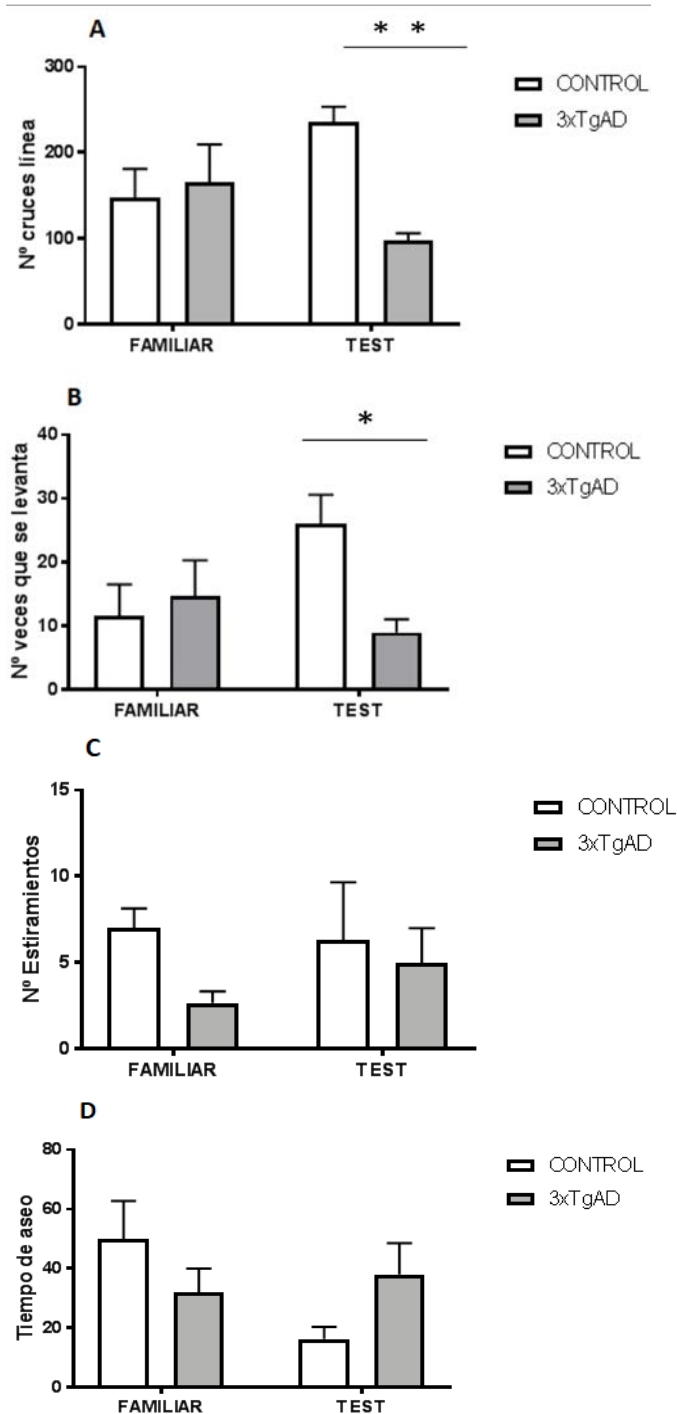


Figura 9. Resultados de conductas de ansiedad y acicalamiento en la tarea de reconocimiento de objetos novedosos (NOR). En la gráfica se representan el número de cruces de línea, de veces que el animal se alzaba o se estiraba y el tiempo en estado de freezing durante la fase de familiarización y la fase de prueba. Se evaluaron el número de cruces de línea (A), el número de veces que el animal se elevaba o levantaba (B), el número de estiramientos (C) y el tiempo que el animal pasaba aseándose de ratonas 3xTgAD (n=3) y controles (n=3). El análisis de los resultados no mostró diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los animales 3xTgAD frente a los controles en ninguno de los parámetros excepto para el cruce de líneas (** $p=0,003$) y el número de elevaciones (* $p= 0,0278$), ambas en la fase de prueba. Para el análisis estadístico se realizó el test no paramétrico de la prueba U de Mann-Whitney), salvo el cruce de líneas, en el número de elevaciones, y el tiempo de aseo, en los cuales, al seguir una distribución normal, aplicamos la el test de t-student.

El número de cruces de línea en la fase de familiarización no mostró diferencias significativas entre ambos grupos, sin embargo, en la fase de test los animales control mostraban un mayor número de cruces de línea y por ende más actividad que los animales transgénicos 3xTgAD de forma significativa ($p=0,003$), analizados mediante la el test de la t.

Este mismo patrón se seguía en el caso del número de veces que los ratones se elevaban, no observándose diferencias significativas durante la fase de familiarización y sí durante la fase de test siendo los ratones transgénicos los que menos número de veces se levantaban ($p=0,03$).

No se encontraron diferencias significativas entre grupos en el número de estiramientos ni en el tiempo de aseo, en ninguna de las dos pruebas (ver tabla 3)

Test de campo abierto	Significación (p)
Nº acercamientos controles familiarización	0,959
Nº acercamientos 3xTgAD familiarización	0,914
Nº acercamientos controles prueba	0,700
Nº acercamientos 3xTgAD prueba	0,700
Tiempo controles familiarización	0,508
Tiempo 3xTgAD familiarización	0,400
Tiempo controles prueba	0,060
Tiempo 3xTgAD prueba	0,100
Cruce de líneas familiarización	1,000
Cruce de líneas prueba	0,003
Estiramientos familiarización	0,100
Estiramientos prueba	1,000
Levantarse familiarización	1,000
Levantarse prueba	0,030
Acicalamiento familiarización	0,300
Acicalamiento prueba	0,100

Tabla 2. Resumen de la significación de los diferentes parámetros evaluados en la prueba de en la tarea de reconocimiento de objetos novedosos (NOR).

4. DISCUSIÓN:

El objetivo de estos experimentos ha sido estudiar y caracterizar los cambios de comportamiento (ansiedad) y cognitivos que tienen lugar en ratones hembra 3xTg-AD.

4.1. Discusión del modelo empleado

Se han desarrollado varios modelos que intentan imitar la EA humana, sin embargo, el modelo 3xTg-AD es el único que expresa tres genes principales asociados con la EA familiar (38,118), así como los cambios conductuales y neuropatológicos correspondientes que se observan en la forma humana (119–122). Como se ha comentado anteriormente, esta triple mutación transgénica expresa APP, PS1 y Tau, y también presenta placas A β y ovillos neurofibrilares, a diferencia de otros ratones transgénicos que tienen sólo una o dos mutaciones y que aunque sí presentan depósitos de amiloide y tau hiperfosforilada, no así los ovillos neurofibrilares (105). En este modelo la bibliografía previa indica que se observa un déficit cognitivo temprano, aunque los resultados no siempre han sido validados por otros grupos, por lo que es un modelo que inicialmente permitiría investigar el desarrollo y el tratamiento de la neurodegeneración en la EA en estadios tempranos (106,107), como es el objetivo de nuestro estudio.

Sin embargo, a pesar de las similitudes anteriormente presentadas, en algunos estudios se han encontrado resultados en este modelo murino que parecen no corresponder del todo con la EA humana; en estos se ha visto que los ratones 3xTg-AD no mostraron un cambio progresivo en los déficits cognitivos ya que los ratones de 2 meses de edad tenían los mismos déficits que los de 15 meses de edad (123), cuando precisamente la EA se caracteriza por un declive progresivo en los déficits cognitivos, con individuos que progresan desde un deterioro cognitivo leve hasta un deterioro cognitivo severo a lo largo del tiempo (124,125). De estos resultados se deduce la importancia de abordar el estudio de los modelos murinos de EA a edades tempranas, con el objetivo de detectar signos de deterioro cognitivo y hallazgos neuropatológicos relevantes, así como estudiar las diferencias de sexo existentes en los modelos. En este sentido, los hallazgos neuropatológicos de Mastrangelo y Bowers (110), que muestran niveles elevados de APP, tau y microglia activada en ratones 3xTg-AD de 2-3 meses de edad, podrían explicar las diferencias conductuales tempranas halladas en este modelo de ratón en algunos estudios.

En cuanto a las diferencias entre los ratones 3xTg-AD machos y hembras, los ratones 3xTg-AD machos jóvenes pueden exhibir una capacidad cognitiva mejorada en comparación con los ratones hembras debido a los efectos protectores de la testosterona. Curiosamente, datos recientes indican que los ratones 3xTg-AD machos gonadectomizados exhiben una función hipocampal disminuida y un aumento importante de A β (126).

4.2. Discusión de los resultados obtenidos

Respecto al comportamiento de los ratones, en algunos estudios se ha observado un aumento de la inquietud en los ratones transgénicos, especialmente cuando se trataba de un ambiente nuevo para el ratón (es decir, el aparato en el que se realizaba la prueba), observándose una inquietud en los ratones 3xTg-AD que ninguno de los animales control llegó a mostrar (127). La emotividad y los cambios psicológicos son indicadores tempranos del desarrollo de la EA humana (128) y estos cambios están claramente modelados por estos ratones.

En general se ha observado que los ratones 3xTg-AD tienen un nivel de ansiedad superior a lo normal, o posiblemente una predisposición a un umbral más bajo de respuesta al miedo, lo que provoca una disminución del comportamiento exploratorio y de la deambulación (127), similar al comportamiento neofóbico que también se ha observado que acontece en animales de 6 meses de edad en este modelo (129). De igual manera también se ha registrado un aumento en la defecación en los ratones 3xTg-AD en el transcurso de varias experimentaciones(127), lo que es indicativo de un estado similar a la ansiedad (113).

Centrándonos en las pruebas de comportamiento específicas de nuestro estudio, como ya se ha comentado previamente la prueba del laberinto elevado es un paradigma validado para evaluar el comportamiento asociado con la ansiedad en roedores (113). De igual manera proporciona medidas simultáneas de locomoción y exploración.

Se ha visto un mayor nivel de ansiedad durante la realización de dicha prueba (112,127). Concretamente en la prueba de laberinto elevado, en varios estudios se han encontrado diferencias en la inmersión de la cabeza, las entradas de brazos cerrados y el tiempo pasado en los brazos cerrados, que fue menor en transgénicos que en los controles (112,127), así como también una interacción significativa entre el genotipo y la defecación (127); todos estos datos reflejan un nivel mayor de ansiedad en los ratones. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en nuestro experimento en cuanto al menor número de entradas totales y en brazos cerrados mayoritariamente por parte de los animales 3xTgAD (se observa una tendencia que no es estadísticamente significativa), lo que indicaría una mayor ansiedad por parte de los ratones transgénicos frente a los controles, que visitan un mayor número de brazos. Estudios previos mostraron que no existían diferencias significativas en cuanto al tiempo pasado dentro

de los brazos abiertos o cerrados, así como tampoco en el número de entradas en los brazos abiertos (112,127), lo que concuerda con los resultados obtenidos en este estudio.

En otro estudio en el que se ha diferenciado entre machos y hembras, se observaron diferencias entre los genotipos en relación con un comportamiento similar a la ansiedad, pero fueron claramente dependientes del sexo y las condiciones de la vivienda (si vivían agrupados o solos). En hembras, los ratones mutantes mostraron niveles de ansiedad más altos en comparación con los controles, pero este efecto se observó exclusivamente en los ratones que vivían agrupados, ya que el aislamiento fue ansiogénico en las hembras control lo que equiparó la determinación de la ansiedad frente a los ratones transgénicos.

En relación con la prueba de campo abierto, también se ha demostrado un mayor nivel de ansiedad (112,127) en los ratones transgénicos. De igual manera estos ratones presentan una mayor hipoactividad frente a los controles. La hipoactividad en la prueba de campo abierto se ha visto en este modelo de ratones a los 6 (130), 7 (131), 10 o 17 (132), 12 (112,133) y 15 (134) meses de edad. Esta hipoactividad se refleja en que los ratones 3xTg-AD se movieron a distancias menores, permanecieron inmóviles durante tiempos más largo, y se quedaban inmóviles en un período más corto (112). Sin embargo, también se ha encontrado hiperactividad a los 6 (129) y 12 (129,130) meses de edad. Esto último concuerda con nuestros datos, ya que nuestros ratones transgénicos presentan un significativo aumento en el número de cruces de líneas, y otros parámetros como el levantamiento en los que, aunque no estadísticamente significativos, sí se muestra aprecia una tendencia a una mayor actividad que los controles.

En esta misma prueba también evaluamos el número de deposiciones fecales. El hallazgo de menos bolos fecales emitidos por mutantes 3xTg-AD en el aparato es una indicación de emocionalidad reducida, mientras lo contrario, es decir, el aumento de heces se encuentra en roedores con un nivel de estrés aumentado, como ya se ha explicado previamente. Los resultados de nuestro estudio, sin embargo, no muestran una diferencia significativa en cuanto a este parámetro en los animales 3xTgAD frente a los controles.

Finalmente, se sabe que el deterioro cognitivo se exagera de una manera dependiente de la edad en ratones 3xTg-AD (129). Los déficits de retención a largo plazo en ratones 3xTg-AD comienzan a manifestarse a la edad de 4-5 meses, y la memoria a corto plazo se ve afectada por la edad de 6-7 meses.

En los humanos, a menudo se estudia la memoria a través del lenguaje hablado o escrito,

mientras que, en los animales, se debe acceder a las funciones cognitivas a través de diferentes tipos de comportamiento en muchos modelos experimentales específicos de memoria y aprendizaje. Las pruebas conductuales que evalúan la capacidad de reconocer un estímulo presentado anteriormente constituyen el núcleo de los modelos de amnesia humana de los animales (135). Dentro de estas pruebas, el test de NOR es muy útil para estudiar memoria a corto plazo, memoria intermedia y memoria a largo plazo mediante la variación del intervalo de retención, es decir, modificando la cantidad de tiempo que los animales deben retener en la memoria de los objetos de muestra presentados durante la fase de familiarización antes de la fase de prueba, cuando uno de los objetos familiares es reemplazado por uno nuevo (136); la memoria se mide por las diferencias en el tiempo de exploración de objetos nuevos y familiares. Es aceptado que la memoria de un solo episodio sería mucho más vulnerable que la basada en la repetición de algunas condiciones, como las respuestas a un reforzador o la asociación de estímulo (137).

Respecto a esta prueba, existen estudios en los que no se han encontrado diferencias entre genotipos, pasando los ratones el mismo tiempo aproximadamente con cada objeto, lo que parece indicar que los ratones no tienen una preferencia por el objeto nuevo (138); mientras que en otros sí se ha visto que los 3xTg-AD fueron deficientes en retención en relación con los controles, siendo poco probable que esta deficiencia se deba a la apatía ya que en la exploración inicial del objeto no se encontraron diferencias (112). Existen contradicciones acerca de cuándo los ratones 3xTg-AD desarrollan un déficit en esta tarea; en algunos se describe un déficit en de memoria a corto plazo en esta prueba en hembras 3xTg-AD a los 6 meses de edad (139,140), y en otros no se encontraron diferencias hasta los 9 meses de edad (141,142). En nuestro caso, no hemos encontrado diferencias en el tiempo o número de visitas absolutas hacia el objeto nuevo o familiar. Sin embargo, el análisis del índice de discriminación mostró que los animales transgénicos mostraban una mayor discriminación hacia el objeto novedoso frente a los animales control que mostraban una tendencia a discriminar más hacia el objeto familiar.

En lo referente a las diferencias entre machos y hembras, el hallazgo de que los ratones hembra 3xTg-AD tienen un déficit cognitivo aumentado (141) en comparación con los ratones 3xTg-AD machos está de acuerdo con los hallazgos antes mencionados en humanos (12). Se han reportado déficits de memoria y aprendizaje entre las hembras y los machos 3xTg-AD, pero las hembras son indistinguibles de machos de la misma edad en el reconocimiento de objetos novedosos (138,141). También se ha encontrado que los ratones hembra 3xTg-AD tienen un aumento en las respuestas de corticosterona a tareas estresantes (141).

En conjunto, los ratones transgénicos parecen mostrar una forma leve de apatía y falta de curiosidad para explorar que ya fue descrita anteriormente (112) y que tiene que ser validada mediante un mayor tamaño muestral.

Precisamente esta es una de las limitaciones de nuestro estudio y por la que creemos que algunos de nuestros resultados no son concluyentes. Creemos que aumentando la muestra y a edades más avanzadas de los ratones podremos encontrar resultados más concluyentes.

Cuanto más entendamos acerca de la neurobiología básica y el comportamiento de los modelos de ratón transgénico de la EA, más podremos beneficiarnos del uso de este modelo de ratones y más posibilidades existirán de aplicar los resultados a la medicina de una manera traslacional (143).

5. AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido posible gracias a la obtención del FONDOCYT2015-3A2-127 por parte de la Dra. María del Mar Pacheco Herrero, gracias al cual se financió la adquisición de los ratones transgénicos y parte del material con el que ha sido realizado este Trabajo Final de Grado.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Manton KC, Gu XL, Ukraintseva S V. Declining prevalence of dementia in the U.S. elderly population. *Adv Gerontol = Uspekhi Gerontol.* 2005;16:30–7.
2. World Health Organization. Dementia: a public health priority. *Dementia* [Internet]. 2012;112. Available from: http://whqlibdoc.who.int/publications/2012/9789241564458_eng.pdf
3. Barage SH, Sonawane KD. Amyloid cascade hypothesis: Pathogenesis and therapeutic strategies in Alzheimer's disease. *Neuropeptides.* 2015 Aug;52:1–18.
4. Niu H, Alvarez-Alvarez I, Guillen-Grima F, Aguinaga-Ontoso I. Prevalence and incidence of Alzheimer's disease in Europe: A meta-analysis. *Neurologia.* 2017 Oct;32(8):523–32.
5. Bettens K, Sleegers K, Van Broeckhoven C. Current status on alzheimer disease molecular genetics: From past, to present, to future. *Hum Mol Genet.* 2010;19(R1).
6. Montine TJ, Phelps CH, Beach TG, Bigio EH, Cairns NJ, Dickson DW, et al. National Institute on Aging-Alzheimer's Association guidelines for the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease: a practical approach. *Acta Neuropathol.* 2012 Jan;123(1):1–11.
7. Perry RJ, Hodges JR. Attention and executive deficits in Alzheimer's disease. A critical review. *Brain.* 1999 Mar;122 (Pt 3):383–404.
8. Lambon Ralph MA, Patterson K, Graham N, Dawson K, Hodges JR. Homogeneity and heterogeneity in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: a cross-sectional and longitudinal study of 55 cases. *Brain.* 2003 Nov;126(Pt 11):2350–62.
9. Hoehn MM, Yahr MD. Parkinsonism: onset, progression, and mortality. 1967. *Neurology.* 2001 Nov;57(10 Suppl 3):S11-26.
10. Cronin-Golomb A, Corkin S, Growdon JH. Visual dysfunction predicts cognitive deficits in Alzheimer's disease. *Optom Vis Sci.* 1995 Mar;72(3):168–76.
11. Suva D, Favre I, Kraftsik R, Esteban M, Lobrinus A, Miklossy J. Primary motor cortex involvement in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1999 Nov;58(11):1125–34.
12. Barnes LL, Wilson RS, Bienias JL, Schneider JA, Evans DA, Bennett DA. Sex differences in the clinical manifestations of Alzheimer disease pathology. *Arch Gen Psychiatry.* 2005;62(6):685–91.
13. Arantxa Guimerà, Xavier Gironès FFC-S. Actualización sobre la Enfermedad de Alzheimer. *REV ISTA ESPAÑOLA Patol Inst Ciencias Neurológicas y Gerontológicas, Univ Int Catalunya* [Internet]. 2012;35:21–48. Available from: <http://revzoilomarinaldo.sld.cu/index.php/zmv/article/view/477>
14. Pozueta J, Lefort R, Shelanski ML. Synaptic changes in Alzheimer's disease and its models. *Neuroscience* [Internet]. 2013 Oct 22 [cited 2018 May 21];251:51–65. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0306452212005416>
15. GS B. Amyloid- β and tau: The trigger and bullet in alzheimer disease pathogenesis. *JAMA Neurol* [Internet]. 2014 Apr 1;71(4):505–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1001/jamaneurol.2013.5847>
16. Braak H, Braak E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol.* 1991;82(4):239–59.
17. Garcia-Osta A, Alberini CM. Amyloid beta mediates memory formation. *Learn Mem* [Internet]. 2009;16(4):267–72. Available from: <http://learnmem.cshlp.org/cgi/doi/10.1101/lm.1310209>
18. Lee L, Kosuri P, Arancio O. Picomolar amyloid- β peptides enhance spontaneous astrocyte calcium transients. *J Alzheimer's Dis.* 2014;38(1):49–62.
19. Ricciarelli R, Puzzo D, Bruno O, Canepa E, Gardella E, Rivera D, et al. A novel mechanism

- for cyclic adenosine monophosphate-mediated memory formation: Role of amyloid beta. *Ann Neurol*. 2014;75(4):602–7.
20. Roselli F, Tirard M, Lu J, Hutzler P, Lamberti P, Livrea P, et al. Soluble beta-amyloid1-40 induces NMDA-dependent degradation of postsynaptic density-95 at glutamatergic synapses. *J Neurosci*. 2005 Nov;25(48):11061–70.
 21. Tu S, Okamoto S, Lipton SA, Xu H. Oligomeric A β -induced synaptic dysfunction in Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener* [Internet]. 2014;9(1):48. Available from: <http://molecularneurodegeneration.biomedcentral.com/articles/10.1186/1750-1326-9-48>
 22. Crews L, Masliah E. Molecular mechanisms of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet*. 2010;19(R1).
 23. Oset Gasque MJ, González MP. Bases moleculares de las enfermedades neurodegenerativas : estrategias neuroprotectoras y neurorreparadoras. Madrid: Vicerrectorado de Desarrollo y Calidad de la Docencia, Universidad Complutense; 2011. 49-62 p.
 24. Buée L, Bussièrè T, Buée-Scherrer V, Delacourte A, Hof PR. Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res Rev* [Internet]. 2000 Aug 1 [cited 2018 May 21];33(1):95–130. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165017300000199?via%3Dihub>
 25. Arai T, Ikeda K, Akiyama H, Shikamoto Y, Tsuchiya K, Yagishita S, et al. Distinct isoforms of tau aggregated in neurons and glial cells in brains of patients with Pick's disease, corticobasal degeneration and progressive supranuclear palsy. *Acta Neuropathol*. 2001 Feb;101(2):167–73.
 26. Goedert M. Tau protein and neurodegeneration. In: *Seminars in Cell and Developmental Biology*. 2004. p. 45–9.
 27. Masliah E, Rockenstein E. Genetically altered transgenic models of Alzheimer's disease. *J Neural Transm Suppl*. 2000;59:175–83.
 28. D. Terry R, Masliah E, Hansen L. Structural Basis of the Cognitive Alterations in Alzheimer Disease. *Alzheimer Disease*. 1994.
 29. Masliah E, Mallory M, Alford M, DeTeresa R, Iwai A, Saitoh T. Molecular Mechanisms of Synaptic Disconnection in Alzheimer's Disease. In: *Connections, Cognition and Alzheimer's Disease* [Internet]. 1997. p. 121–40. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-60680-9_9
 30. DeKosky ST, Scheff SW. Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer's disease: correlation with cognitive severity. *Ann Neurol*. 1990 May;27(5):457–64.
 31. Terry RD, Peck A, DeTeresa R, Schechter R, Horoupian DS. Some morphometric aspects of the brain in senile dementia of the alzheimer type. *Ann Neurol*. 1981;10(2):184–92.
 32. Trojanowski JQ, Lee VM. "Fatal attractions" of proteins. A comprehensive hypothetical mechanism underlying Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *Ann N Y Acad Sci* [Internet]. 2000;924:62–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11193803>
 33. Crews L, Rockenstein E, Masliah E. APP transgenic modeling of Alzheimer's disease: Mechanisms of neurodegeneration and aberrant neurogenesis. Vol. 214, *Brain Structure and Function*. 2010. p. 111–26.
 34. Beach TG, Walker R, McGeer EG. Patterns of gliosis in alzheimer's disease and aging cerebrum. *Glia*. 1989;2(6):420–36.
 35. Rogers J, Lubner-Narod J, Styren SD, Civin WH. Expression of immune system-associated antigens by cells of the human central nervous system: Relationship to the pathology of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 1988;9(C):339–49.
 36. Masliah E, Mallory M, Hansen L, Alford M, Albright T, Terry R, et al. Immunoreactivity of CD45, a protein phosphotyrosine phosphatase, in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*. 1991;83(1):12–20.

37. Vanguilder HD, Yan H, Farley JA, Sonntag WE, Freeman WM. Aging alters the expression of neurotransmission-regulating proteins in the hippocampal synaptoproteome. *J Neurochem*. 2010;113(6):1577–88.
38. Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kaye R, et al. Triple-Transgenic Model of Alzheimer’s Disease with Plaques and Tangles. *Neuron* [Internet]. 2003 Jul 31;39(3):409–21. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00434-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00434-3)
39. Scheff SW, DeKosky ST, Price DA. Quantitative assessment of cortical synaptic density in Alzheimer’s disease. *Neurobiol Aging* [Internet]. 1990 Jan 1;11(1):29–37. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/0197-4580\(90\)90059-9](http://dx.doi.org/10.1016/0197-4580(90)90059-9)
40. Scheff SW, Price DA. Synapse loss in the temporal lobe in Alzheimer’s disease. *Ann Neurol*. 1993 Feb;33(2):190–9.
41. Masliah E, Mallory M, Hansen L, Richard DT, Alford M, Terry R. Synaptic and neuritic alterations during the progression of Alzheimer’s disease. *Neurosci Lett* [Internet]. 1994 Jun 6 [cited 2018 May 21];174(1):67–72. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/030439409490121X>
42. Scheff SW, Price DA, Schmitt FA, Scheff MA, Mufson EJ. Synaptic Loss in the Inferior Temporal Gyrus in Mild Cognitive Impairment and Alzheimer Disease. Vol. 24, *Journal of Alzheimer’s disease : JAD*. 2011. p. 547–57.
43. AM L, Cullum C, Satumtira S, al et. Contribution of asymmetric synapse loss to lateralizing clinical deficits in frontotemporal dementias. *Arch Neurol* [Internet]. 2001 Aug 1;58(8):1233–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1001/archneur.58.8.1233>
44. Samuel W, Masliah E, Hill LR, Butters N, Terry R. Hippocampal connectivity and Alzheimer’s dementia: effects of synapse loss and tangle frequency in a two-component model. *Neurology*. 1994 Nov;44(11):2081–8.
45. Scheff SW, Neltner JH, Nelson PT. Is synaptic loss a unique hallmark of Alzheimer’s disease? *Biochem Pharmacol* [Internet]. 2014 Apr 15 [cited 2018 May 21];88(4):517–28. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0006295214000033>
46. Perry VH, Nicoll JAR, Holmes C. Microglia in neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol*. 2010 Apr;6(4):193–201.
47. Cribbs DH, Berchtold NC, Perreau V, Coleman PD, Rogers J, Tenner AJ, et al. Extensive innate immune gene activation accompanies brain aging, increasing vulnerability to cognitive decline and neurodegeneration: a microarray study. Vol. 9, *Journal of Neuroinflammation*. 2012. p. 179.
48. Arnardottir HH, Dalli J, Colas RA, Shinohara M, Serhan CN. Aging Delays Resolution of Acute Inflammation in Mice: Reprogramming the Host Response with Novel Nano-Proresolving Medicines. *J Immunol* [Internet]. 2014 Oct 15;193(8):4235 LP-4244. Available from: <http://www.jimmunol.org/content/193/8/4235.abstract>
49. Miklossy J. Chronic inflammation and amyloidogenesis in Alzheimer’s disease -- role of Spirochetes. *J Alzheimers Dis*. 2008 May;13(4):381–91.
50. Rubio-Perez JM, Morillas-Ruiz JM. A Review: Inflammatory Process in Alzheimer’s Disease, Role of Cytokines. Vol. 2012, *The Scientific World Journal*. 2012.
51. Wyss-Coray T, Rogers J. Inflammation in Alzheimer Disease—A Brief Review of the Basic Science and Clinical Literature. Vol. 2, *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2012.
52. Zhang B, Gaiteri C, Bodea LG, Wang Z, Mcelwee J, Podtelezchnikov AA, et al. Integrated systems approach identifies genetic nodes and networks in late-onset Alzheimer’s disease. *Cell* [Internet]. 2013;153(3):707–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23622250%5Cnhttp://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2013.03.030>
53. Michell-Robinson MA, Touil H, Healy LM, Owen DR, Durafourt BA, Bar-Or A, et al. Roles

- of microglia in brain development, tissue maintenance and repair. *Brain*. 2015;138(5):1138–59.
54. Ji K, Akgul G, Wollmuth LP, Tsirka SE. Microglia Actively Regulate the Number of Functional Synapses. *PLoS One*. 2013;8(2).
 55. Medeiros R, Figueiredo CP, Pandolfo P, Duarte FS, Prediger RDS, Passos GF, et al. The role of TNF-alpha signaling pathway on COX-2 upregulation and cognitive decline induced by beta-amyloid peptide. *Behav Brain Res*. 2010;209(1):165–73.
 56. Kitazawa M, Cheng D, Tsukamoto MR, Koike MA, Wes PD, Vasilevko V, et al. Blocking IL-1 Signaling Rescues Cognition, Attenuates Tau Pathology, and Restores Neuronal - Catenin Pathway Function in an Alzheimer's Disease Model. *J Immunol [Internet]*. 2011;187(12):6539–49. Available from: <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.1100620>
 57. Prieto GA, Snigdha S, Baglietto-Vargas D, Smith ED, Berchtold NC, Tong L, et al. Synapse-specific IL-1 receptor subunit reconfiguration augments vulnerability to IL-1 β in the aged hippocampus. *Proc Natl Acad Sci [Internet]*. 2015;112(36):E5078–87. Available from: <http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1514486112>
 58. Najjar S, Pearlman DM, Alper K, Najjar A, Devinsky O. Neuroinflammation and psychiatric illness. *J Neuroinflammation*. 2013 Apr;10:43.
 59. Monge-Argilés JA, Sánchez-Payá J, Muñoz-Ruiz C, Pampliega-Pérez A, Montoya-Gutiérrez J, Leiva-Santana C. Biomarcadores en el líquido cefalorraquídeo de pacientes con deterioro cognitivo leve: Metaanálisis de su capacidad predictiva para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer. *Rev Neurol*. 2010;50(4):193–200.
 60. McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: Report of the NINCDS-ADRDA Work Group* under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology [Internet]*. 1984;34(7):939–939. Available from: <http://www.neurology.org/cgi/doi/10.1212/WNL.34.7.939>
 61. Humpel C. Identifying and validating biomarkers for Alzheimer's disease. Vol. 29, *Trends in Biotechnology*. 2011. p. 26–32.
 62. Blennow K, Hampel H, Weiner M, Zetterberg H. Cerebrospinal fluid and plasma biomarkers in Alzheimer disease. Vol. 6, *Nature Reviews Neurology*. 2010. p. 131–44.
 63. American Psychiatric Association. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders [Internet]*. Arlington. 2013. 991 p. Available from: http://encore.llu.edu/iii/encore/record/C__Rb1280248__SDSM-V__PO,2__Orightresult__X3;jsessionid=ABB7428ECBC4BA66625EDD0E0C5AAFA5?lang=eng&suite=cobalt%5Cnhttp://books.google.com/books?id=ElbMlwEACAAJ&pgis=1
 64. ICD-10 World Health Organization. *The ICD-10 Classification of Mental and Behavioural Disorders*. *Int Classif*. 1992;10:1–267.
 65. Robles A, Del Ser T, Alom J, Peña-Casanova Grupo Asesor J. Propuesta de criterios para el diagnóstico clínico del deterioro cognitivo ligero, la demencia y la enfermedad de Alzheimer. *Neurología*. 2002;17(1):17–32.
 66. Chiang K, Koo EH. Emerging Therapeutics for Alzheimer's Disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol [Internet]*. 2014 Jan 6;54(1):381–405. Available from: <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-011613-135932>
 67. Huang Y, Mucke L. Alzheimer Mechanisms and Therapeutic Strategies. *Cell*. 2013;148(6):1204–22.
 68. Francis PT, Nordberg A, Arnold SE. A preclinical view of cholinesterase inhibitors in neuroprotection: Do they provide more than symptomatic benefits in Alzheimer's disease? Vol. 26, *Trends in Pharmacological Sciences*. 2005. p. 104–11.
 69. Folch J, Ettcheto M, Petrov D, Abad S, Pedros I, Marin M, et al. Review of the advances in treatment for Alzheimer disease: Strategies for combating beta-amyloid protein. *Neurologia*. 2018 Jan;33(1):47–58.

70. Lambert J-C, Heath S, Even G, Campion D, Sleegers K, Hiltunen M, et al. Genome-wide association study identifies variants at CLU and CR1 associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet* [Internet]. 2009;41(10):1094–9. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/ng.439>
71. Harold D, Abraham R, Hollingworth P, Sims R, Gerrish A, Hamshere ML, et al. Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet* [Internet]. 2009;41(10):1088–93. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19734902>
72. Oda T, Pasinetti GM, Osterburg HH, Anderson C, Johnson SA, Finch CE. Purification and characterization of brain clusterin. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 1994;204(3):1131–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7980587>
73. Oda T, Wals P, Osterburg HH, Johnson SA, Pasinetti GM, Morgan TE, et al. Clusterin (apoJ) alters the aggregation of amyloid β -peptide (A β 1-42) and forms slowly sedimenting a β complexes that cause oxidative stress. *Exp Neurol*. 1995;136(1):22–31.
74. Harel A, Wu F, Mattson MP, Morris CM, Yao PJ. Evidence for CALM in Directing VAMP2 Trafficking. *Traffic*. 2008;9(3):417–29.
75. Bettens K, Brouwers N, Engelborghs S, De Pooter T, De Deyn PP, Sleegers K, et al. DNMBP is genetically associated with Alzheimer dementia in the Belgian population. *Neurobiol Aging*. 2009;30(12):2000–9.
76. Wyss-Coray T, Yan F, Lin AH-T, Lambris JD, Alexander JJ, Quigg RJ, et al. Prominent neurodegeneration and increased plaque formation in complement-inhibited Alzheimer's mice. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2002;99(16):10837–42. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.162350199>
77. Bell RD, Sagare AP, Friedman AE, Bedi GS, Holtzman DM, Deane R, et al. Transport pathways for clearance of human Alzheimer's amyloid beta-peptide and apolipoproteins E and J in the mouse central nervous system. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2007;27(5):909–18.
78. Hammad SM, Ranganathan S, Loukinova E, Twal WO, Argraves WS. Interaction of apolipoprotein J-amyloid beta-peptide complex with low density lipoprotein receptor-related protein-2 megalin - A mechanism to prevent pathological accumulation of amyloid beta-peptide. *J Biol Chem*. 1997;272(30):18644–9.
79. Cole GM, Ard MD. Influence of lipoproteins on microglial degradation of Alzheimer's amyloid beta-protein. Vol. 50, *Microscopy Research and Technique*. 2000. p. 316–24.
80. Bartl MM, Luckenbach T, Bergner O, Ullrich O, Koch-Brandt C. Multiple receptors mediate apoJ-dependent clearance of cellular debris into nonprofessional phagocytes. *Exp Cell Res*. 2001;271(1):130–41.
81. Mhatre SD, Tsai CA, Rubin AJ, James ML, Andreasson KI. Microglial Malfunction: The Third Rail in the Development of Alzheimer's Disease. Vol. 38, *Trends in Neurosciences*. 2015. p. 621–36.
82. Zhu Y, Nwabuisi-Heath E, Dumanis SB, Tai LM, Yu C, Rebeck GW, et al. APOE genotype alters glial activation and loss of synaptic markers in mice. *Glia*. 2012;60(4):559–69.
83. Borenstein AR, Copenhaver CI, Mortimer JA. Early-life risk factors for Alzheimer disease. Vol. 20, *Alzheimer Disease and Associated Disorders*. 2006. p. 63–72.
84. Aubert L, Pichierrri S, Hommet C, Camus V, Berrut G, De Decker L. Association between comorbidity burden and rapid cognitive decline in individuals with mild to moderate alzheimer's disease. *J Am Geriatr Soc*. 2015;63(3):543–7.
85. Magaki S, Yong WH, Khanlou N, Tung S, Vinters H V. Comorbidity in dementia: Update of an ongoing autopsy study. *J Am Geriatr Soc*. 2014;62(9):1722–8.
86. Sutherland GT, Lim J, Srikanth V, Bruce DG. Epidemiological Approaches to Understanding the Link Between Type 2 Diabetes and Dementia. *J Alzheimers Dis*. 2017;59(2):393–403.
87. Bharadwaj P, Wijesekara N, Liyanapathirana M, Newsholme P, Ittner L, Fraser P, et al.

- The Link between Type 2 Diabetes and Neurodegeneration: Roles for Amyloid-beta, Amylin, and Tau Proteins. *J Alzheimers Dis.* 2017;59(2):421–32.
88. Baglietto-Vargas D, Shi J, Yaeger DM, Ager R, LaFerla FM. Diabetes and Alzheimer's disease crosstalk. Vol. 64, *Neuroscience and Biobehavioral Reviews.* 2016. p. 272–87.
 89. Morris JK, Vidoni ED, Honea RA, Burns JM. Impaired glycemia increases disease progression in mild cognitive impairment. *Neurobiol Aging.* 2014;35(3):585–9.
 90. Fukazawa R, Hanyu H, Sato T, Shimizu S, Koyama S, Kanetaka H, et al. Subgroups of Alzheimer's Disease Associated with Diabetes Mellitus Based on Brain Imaging. *Dement Geriatr Cogn Disord* [Internet]. 2013;35(5–6):280–90. Available from: <https://www.karger.com/DOI/10.1159/000348407>
 91. Hogervorst E, Bandelow S, Moffat SD. Increasing testosterone levels and effects on cognitive functions in elderly men and women: a review. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* [Internet]. 2005;4(5):531–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16266286>
 92. Lei ZM, Rao C V., Kornyei JL, Licht P, Haitt ES. Novel Expression of Human Chorionic Gonadotropin/Luteinizing Hormone Receptor Gene in Brain. *Endocrinology.* 1993;125(5):2262–70.
 93. al-Hader AA, Lei ZM, Rao C V. Novel expression of functional luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptors in cultured glial cells from neonatal rat brains. *Biol Reprod* [Internet]. 1997;56(2):501–7. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9116153
 94. AL-Hader AA, Lei ZM, Rao C V. Neurons from fetal rat brains contain functional luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptors. *Biol Reproduction* [Internet]. 1997;56:1071–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9160703>
 95. Bowen RL, Smith MA, Harris PLR, Kubat Z, Martins RN, Castellani RJ, et al. Elevated luteinizing hormone expression colocalizes with neurons vulnerable to Alzheimer's disease pathology. *J Neurosci Res.* 2002;70(3):514–8.
 96. Grinan-Ferre C, Palomera-Avalos V, Puigoriol-Illamola D, Camins A, Porquet D, Pla V, et al. Behaviour and cognitive changes correlated with hippocampal neuroinflammation and neuronal markers in female SAMP8, a model of accelerated senescence. *Exp Gerontol.* 2016 Jul;80:57–69.
 97. Dickson DW, Crystal HA, Bevona C, Honer W, Vincent I, Davies P. Correlations of synaptic and pathological markers with cognition of the elderly. *Neurobiol Aging.* 1995;16(3):285–304.
 98. Flood DG, Coleman PD. Hippocampal plasticity in normal aging and decreased plasticity in Alzheimer's disease. *Prog Brain Res.* 1990;83:435–43.
 99. Masliah E, Mallory M, Alford M, DeTeresa R, Hansen LA, McKeel DW, et al. Altered expression of synaptic proteins occurs early during progression of Alzheimer's disease. *Neurology.* 2001;56(1):127–9.
 100. Sze CI, Troncoso JC, Kawas C, Mouton P, Price DL, Martin LJ. Loss of the presynaptic vesicle protein synaptophysin in hippocampus correlates with cognitive decline in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1997 Aug;56(8):933–44.
 101. Terry RD, Masliah E, Salmon DP, Butters N, DeTeresa R, Hill R, et al. Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann Neurol.* 1991 Oct;30(4):572–80.
 102. Nelson PT, Alafuzoff I, Bigio EH, Bouras C, Braak H, Cairns NJ, et al. Correlation of Alzheimer disease neuropathologic changes with cognitive status: a review of the literature. *J Neuropathol Exp Neurol* [Internet]. 2012;71(5):362–81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22487856>
 103. Damasio H, Grabowski T, Frank R, Galaburda AM, Damasio AR. The return of Phineas

- Gage: clues about the brain from the skull of a famous patient. *Science*. 1994 May;264(5162):1102–5.
104. Ameen-Ali KE, Wharton SB, Simpson JE, Heath PR, Sharp P, Berwick J. Review: Neuropathology and behavioural features of transgenic murine models of Alzheimer's disease. Vol. 43, *Neuropathology and Applied Neurobiology*. 2017. p. 553–70.
 105. Tiraboschi P, Sabbagh MN, Hansen LA, Salmon DP, Merdes A, Gamst A, et al. Alzheimer disease without neocortical neurofibrillary tangles: "A second look." *Neurology*. 2004;62(7):1141–7.
 106. Ahmad-Annuar A, Tabrizi SJ, Fisher EMC. Mouse models as a tool for understanding neurodegenerative diseases. *Curr Opin Neurol* [Internet]. 2003;16(4):451–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12869802>
 107. Oddo S, Vasilevko V, Caccamo A, Kitazawa M, Cribbs DH, LaFerla FM. Reduction of soluble A β and tau, but not soluble A β alone, ameliorates cognitive decline in transgenic mice with plaques and tangles. *J Biol Chem*. 2006;281(51):39413–23.
 108. Baglietto-Vargas D, Chen Y, Suh D, Ager RR, Rodriguez-Ortiz CJ, Medeiros R, et al. Short-term modern life-like stress exacerbates A β -pathology and synapse loss in 3xTg-AD mice. *J Neurochem*. 2015;134(5):915–26.
 109. Corona C, Masciopinto F, Silvestri E, Viscovo A Del, Lattanzio R, Sorda RL, et al. Dietary zinc supplementation of 3xTg-AD mice increases BDNF levels and prevents cognitive deficits as well as mitochondrial dysfunction. *Cell Death Dis*. 2010;1.
 110. Mastrangelo MA, Bowers WJ. Detailed immunohistochemical characterization of temporal and spatial progression of Alzheimer's disease-related pathologies in male triple-transgenic mice. Vol. 9, *BMC Neuroscience*. 2008. p. 81.
 111. Billings LM, Oddo S, Green KN, McLaugh JL, LaFerla FM. Intraneuronal A β causes the onset of early Alzheimer's disease-related cognitive deficits in transgenic mice. *Neuron*. 2005;45(5):675–88.
 112. Filali M, Lalonde R, Theriault P, Julien C, Calon F, Planel E. Cognitive and non-cognitive behaviors in the triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease expressing mutated APP, PS1, and Mapt (3xTg-AD). *Behav Brain Res*. 2012;234(2):334–42.
 113. Walsh RN, Cummins RA. The open-field test: A critical review. *Psychol Bull*. 1976;83(3):482–504.
 114. Podhorna J, Brown RE. Strain differences in activity and emotionality do not account for differences in learning and memory performance between C57BL/6 and DBA/2 mice. *Genes, Brain Behav*. 2002;1(2):96–110.
 115. Psotta L, Rockahr C, Gruss M, Kirches E, Braun K, Lessmann V, et al. Impact of an additional chronic BDNF reduction on learning performance in an Alzheimer mouse model. *Front Behav Neurosci* [Internet]. 2015;9(March):1–10. Available from: http://www.frontiersin.org/Behavioral_Neuroscience/10.3389/fnbeh.2015.00058/abstract
 116. Brown RE, Corey SC, Moore a K. Differences in Measures of Exploration and Fear in Mhc-Congenic C57bl/6j and B6-H-2k Mice. *Behav Genet*. 1999;29(4):263–71.
 117. Xifro X, Vidal-sancho L, Fournier A. Molecular Neurobiology Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) enhances hippocampal synaptic plasticity and improves memory performance in Huntington ' s disease. 2018;
 118. St George-Hyslop PH. Genetic factors in the genesis of Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci*. 2000;924:1–7.
 119. Witting W, Kwa IH, Eikelenboom P, Mirmiran M, Swaab DF. Alterations in the circadian rest-activity rhythm in aging and Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry*. 1990;27(6):563–72.
 120. Mesulam M. A plasticity-based theory of the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Ann new york Acad Sci*. 2000;924:42–52.
 121. Panegyres PK. The contribution of the study of neurodegenerative disorders to the

- understanding of human memory. Vol. 97, QJM - Monthly Journal of the Association of Physicians. 2004. p. 555–67.
122. Vandenberghe R, Tournoy J. Cognitive aging and Alzheimer's disease. Vol. 81, Postgraduate Medical Journal. 2005. p. 343–52.
 123. Stevens LM, Brown RE. Reference and working memory deficits in the 3xTg-AD mouse between 2 and 15-months of age: A cross-sectional study. Behav Brain Res [Internet]. 2015;278:496–505. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2014.10.033>
 124. Weintraub S, Wicklund AH, Salmon DP. The neuropsychological profile of Alzheimer disease. Vol. 2, Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine. 2012.
 125. Zola SM, Manzanares CM, Clopton P, Lah JJ, Levey AI. A behavioral task predicts conversion to mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. Vol. 28, American journal of Alzheimer's disease and other dementias. 2013. p. 179–84.
 126. Rosario ER, Carroll JC, Oddo S, LaFerla FM, Pike CJ. Androgens Regulate the Development of Neuropathology in a Triple Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease. J Neurosci [Internet]. 2006;26(51):13384–9. Available from: <http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.2514-06.2006>
 127. Sterniczuk R, Antle MC, Laferla FM, Dyck RH. Characterization of the 3xTg-AD mouse model of Alzheimer's disease: Part 2. Behavioral and cognitive changes. Brain Res [Internet]. 2010;1348:149–55. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2010.06.011>
 128. Piccininni M, Di Carlo A, Baldereschi M, Zaccara G, Inzitari D. Behavioral and psychological symptoms in Alzheimer's disease: frequency and relationship with duration and severity of the disease. Dement Geriatr Cogn Disord. 2005;19(5–6):276–81.
 129. Giménez-Llort L, Blázquez G, Cañete T, Johansson B, Oddo S, Tobeña A, et al. Modeling behavioral and neuronal symptoms of Alzheimer's disease in mice: A role for intraneuronal amyloid. Vol. 31, Neuroscience and Biobehavioral Reviews. 2007. p. 125–47.
 130. Pietropaolo S, Sun Y, Li R, Brana C, Feldon J, Yee BK. Limited Impact of Social Isolation on Alzheimer-Like Symptoms in a Triple Transgenic Mouse Model. Behav Neurosci. 2009;123(1):181–95.
 131. Nelson RL, Guo Z, Halagappa VM, Pearson M, Gray AJ, Matsuoka Y, et al. Prophylactic treatment with paroxetine ameliorates behavioral deficits and retards the development of amyloid and tau pathologies in 3xTgAD mice. Exp Neurol. 2007;205(1):166–76.
 132. Halagappa VKM, Guo Z, Pearson M, Matsuoka Y, Cutler RG, LaFerla FM, et al. Intermittent fasting and caloric restriction ameliorate age-related behavioral deficits in the triple-transgenic mouse model of Alzheimer's disease. Neurobiol Dis. 2007;26(1):212–20.
 133. Arsenault D, Julien C, Tremblay C, Calon F. DHA improves cognition and prevents dysfunction of entorhinal cortex neurons in 3xTg-AD mice. PLoS One. 2011;6(2).
 134. Gulinello M, Gertner M, Mendoza G, Schoenfeld BP, Oddo S, LaFerla F, et al. Validation of a 2-day water maze protocol in mice. Behav Brain Res. 2009;196(2):220–7.
 135. Baxter MG. "I've seen it all before": explaining age-related impairments in object recognition. Theoretical comment on Burke et al. (2010). Behav Neurosci. 2010 Oct;124(5):706–9.
 136. Tagliavola G, Hogan D, Zhang WR, Dineley KT. Intermediate- and long-term recognition memory deficits in Tg2576 mice are reversed with acute calcineurin inhibition. Behav Brain Res. 2009;200(1):95–9.
 137. Ennaceur A, Delacour J. A new one - trial test for neurobiological studies of memory in rats . 1 " Behavioral data. Behav Brain Res. 1988;31:47–59.
 138. Stover KR, Campbell MA, Van Winssen CM, Brown RE. Early detection of cognitive deficits in the 3xTg-AD mouse model of Alzheimer's disease. Behav Brain Res [Internet].

- 2015;289:29–38. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2015.04.012>
139. Chen Y, Liang Z, Blanchard J, Dai C-L, Sun S, Lee MH, et al. A Non-transgenic Mouse Model (icv-STZ Mouse) of Alzheimer's Disease: Similarities to and Differences from the Transgenic Model (3xTg-AD Mouse). *Mol Neurobiol* [Internet]. 2013;47(2):711–25. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s12035-012-8375-5>
 140. Blanchard J, Wanka L, Tung YC, Cárdenas-Aguayo MDC, Laferla FM, Iqbal K, et al. Pharmacologic reversal of neurogenic and neuroplastic abnormalities and cognitive impairments without affecting A β and tau pathologies in 3xTg-AD mice. *Acta Neuropathol*. 2010;120(5):605–21.
 141. Clinton LK, Billings LM, Green KN, Caccamo A, Ngo J, Oddo S, et al. Age-dependent sexual dimorphism in cognition and stress response in the 3xTg-AD mice. *Neurobiol Dis*. 2007;28(1):76–82.
 142. Martinez-Coria H, Green KN, Billings LM, Kitazawa M, Albrecht M, Rammes G, et al. Memantine improves cognition and reduces Alzheimer's-like neuropathology in transgenic mice. *Am J Pathol*. 2010;176(2):870–80.
 143. Brown RE. Improving animal models for nervous system disorders. *Genes, Brain Behav*. 2012;11(6):753–6.