



**ENRIQUECIMIENTO AMBIENTAL
EN RATONES 3xTgAD
(MODELO DE ALZHEIMER):
PERFILES COGNITIVOS Y EMOTIVOS**

Gloria Blázquez Romero
TESIS DOCTORAL



Bellaterra, 2011

**ENRIQUECIMIENTO AMBIENTAL
EN RATONES 3xTgAD
(MODELO DE ALZHEIMER):
PERFILES COGNITIVOS Y EMOTIVOS**

TESIS DOCTORAL DE
Gloria Blázquez Romero

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

Este trabajo ha sido realizado bajo la supervisión de
el Dr. Alberto Fernández Teruel y la Dra. Lydia Giménez Llorc.

En el Departamento de Psiquiatría y Medicina Legal - Unidad de
Psicología Médica - Instituto de Neurociencias de la Universidad
Autónoma de Barcelona.



Bellaterra, 2011

A mi familia,
y a mis amigos.

AGRADECIMIENTOS

Recuerdo el día que llegué a la Unidad de Psicología Médica. Estaba emocionadísima por entrar en el idílico mundo de la investigación. Hoy, ocho años después, con un EURATools agotador aunque gratificante y, por fin, la Tesis (sobran las palabras) en la “cesta de la vida”, sé que además del enriquecimiento intelectual y lo estimulante de la ciencia, me llevo lo que más aprecio hoy y seguro recordaré siempre, un montón de buenos amigos.

Me gustaría agradecer a todos vuestros empujones todas las veces que he querido quedarme sentada en la subida al “Everest”, que no han sido pocas. Sin vosotros, de verdad que no hubiera sido posible terminar esta Tesis. Espero no olvidarme a nadie, porque sois muchas las personas que habéis contribuido a la realización de este trabajo de forma directa e indirecta. A todos vosotros, GRACIAS.

En primer lloc voldria agrair als meus directors de Tesi, el Dr. Albert Fernández Teruel i la Dra. Lydia Giménez Llort, haver-me guiat en aquest projecte. Lydia, gràcies per la oportunitat de participar en aquest estudi i l'energia en les primeres etapes. Albero, moltes gràcies per totes les hores invertides en la Tesi des dels inicis, ara fa 8 anys, fins a l'últim dia, per confiar sempre en nosaltres, i per fomentar el comanyerisme i el treball en equip. Gràcies a tot això m'enduc grans amics que han trascendit de la vida laboral, enriquint-me com a persona. Gràcies també per ensenyar-me tot el que sé sobre com fer ciència, sempre seràs el nostre “pare científic”. També volia agrair al Dr. Adolf Tobeña tots els consells científics que ens han servit de guia al llarg de la Tesi, i la seva disposició a ajudar.

A Lidia Manzo y Juan Beauquis, gracias por vuestra integridad como científicos y ofrecerme voluntariamente los trabajos histológicos realizados con los

ratones de esta Tesis. I a la M^a del Mar Castillo, gràcies per l'ajuda en l'extracció i tractament de les mostres d'aquest treball.

Gràcies també a tots els companys de la Unitat de Psicologia Mèdica, que han fet que el dia a dia hagi estat més agradable. Magda, gracias por las charlas sobre la vida en los desayunos al sol, y aguantarme el pronto! I a la resta de companys de la Unitat, Óscar, Sira, Jaume, Sandreta, David l'humà, Rosa M^a, Ana, Sandra, Bea, Rafa, Bets, Èlia i Montseta, pels ànims i aportar cadascú un popurrí de coses al dia a dia.

Vull agrair especialment tota l'ajuda rebuda, que en aquest cas ha estat directa i indirecta, als meus amics i companys del psiquiàtric. Amb ells vaig passar una "belle epoque" espectacular, i espero poder seguir disfrutant de tots en centenars de trobades de caniches!

El tripartit sempre estarà unit! Toni i Regina, he tingut la sort de compartir aquesta feina amb vosaltes i heu estat uns companys ESPECTACULARS durant tots aquest anys! Sou unes persones amb uns valors admirables. M'he divertit moltíssim amb vosaltes, i a sobre com a bons dofins heu salvat al ballenato barat tantes vegades! Castanyet, moltes gràcies per ajudar-me en totes les fases de la Tesi, des dels tractaments, fins a la construcció final. No es pot tenir un company de feina millor. I Vecchia, qui ens ho havia de dir el primer dia, com m'has espavilat! Ara ets una de les meves millors amigues. Gràcies per totes les aventures junts, els congressos a Trieste, Glasgow, Rodes, Amsterdam, el naixement del Canyet, el cae la noche cae el caniche, el pis del cangrejo, el cuarto oscuro, els dinars al turonet, la verge de l'EURATools, les contractures col·lectives, les migdiades al sol, els massatges, el puente puente, l'era joven, la pelito sequito, la bíor y el gondrí, per no tarifar ni encaprar-vos quasi mai... Moltes gràcies per tantes històries!!

Esthernon, gràcies per l'energia, les idees boges i las risas enlatadas, visca Kurna-yala! Bon Carme, caramba, curt però intens! Ja ens coneixiem de vides passades pero encara ens queden assumptes pendants! Miss Palència, tu també m'has aportat molt, les xerrades al cotxe, el Bailey's... tot sabia miniyó! Yola, que decirte, cae la noche, cae el caniche! Cuantas historias, el pis del cangrejo, la cárcel... no te digo na' y te lo digo to', y que haya muchas más! Bàrbara y Helga, me n'alegro molt que vosaltres també passessiu pel psiquiàtric, dues amigues més al cistell. Joanet, un caniche més, sort de les teves històries per fer-me partir, "a mi no me vengas con penas". Maschio, no vaig saber escoltar els teus sabis consells, però ara et dic sí a tot. Sempre ens unirà l'átame (ho sento, ho havia de recordar). Miriam una psico més gràcies a l'SMART, quin bé ha fet tenir-lo al nostre despatx! Fineta, Rui i Karla, vosaltres també heu aportat seny a tota la bogeria. Heela, thanks for opening yourself to us in such a short time, we had lovely times with you. Als de psicobio, l'Anna, la Silvia, la Irene y el Jacobo, que també han compartit una part del seu temps amb nosaltres i tan de bo els nostres camins es tornin a creuar.

And to the EURAToolers, thanks for such a really good times in Barcelona and Stockholm! Although the work was exhausting you made it worth! Margarita, Pernilla and Martina, thanks for opening your homes and families to us, all the chats together, trips around Catalunya and Sweden, paellas, and our first words in Swedish (won't forget them, don't worry). Ame, our papichulo, thanks for being always so kind and being our conscience. Johan, thanks for the special times at the beginning. Polinka, la Señora de los anillos! Además de por los buenos ratos en Barcelona, gracias por tratarme tan bien cuando estuve en Oxford y enseñarme mejicano, güey! Andrecito and Nada, although we met at the end of the project, we had time to enjoy a lot with both of you! Thank you for your hospitality and friendship, it has been a pleasure to meet you all. And to the rest of the EURAToolers, Ulrika, Adam, Matthias, Carola, etc. thanks for all the good times together.

Als meus amics, l'extensió de la meva família, sense els quals no hagués pogut fer-ho. Adri, moltíssimes gràcies per estar, des dels 10 anys, incondicionalment al meu costat! Espero estar a la teva alçada cada cop que em necessitis! Óscar, gracias por tirar de mi en una de las etapas más duras. Ha sido muy importante para mi. Clara, Pablo, Nati, Emma y Núria B., muchas gracias por vuestra amistad, vuestra ayuda, y demostrarme que puedo contar siempre con vosotros. A mis cousins, Carme, Maria y Sergio que, como siempre, también han contribuido directamente en el trabajo de Tesis, además de reírse de todas las historietas de estos años, y a mis tíos Toni y Carmen que también me han enseñado mucho. A la Laura, que cuida de mis hermanos y de mi como si fuésemos sus hijos, muchísimas gracias! A tots els amics que han deixat petja a la meva vida i d'una manera o altre han participat en aquest projecte, Nani, Marisa, Tania, Fran, Gemma A., Gemma G., Laia, Núria E., i les queens (Bea, Alexia, Madi i Mel). Y a R. Carrillo que también ha contribuido a superar el duro final.

Y por último y los más importantes, a mi familia. Les dedico esta Tesis a mis padres, Ángel y Aurora, que desde pequeños nos inculcaron que el mejor legado que uno puede tener es el conocimiento, y han trabajado siempre para ello. Mil gracias! En especial a mi madre, la persona que más nos ha dado a todos, y más admiro. A mis hermanos Cristina y Ángel, que también han sufrido esta Tesis y en todo momento les he tenido a mi lado. Y a mi yaya, que estaría orgullosísima.

A les rates i ratolins que ens faciliten el coneixement, vides que hem de tractar amb el màxim de respecte, i que tan de bo un dia no necessitem. Al Ministerio de Educación y Ciencia (SAF2006-13642), EME2005-140267, EME2006-140335, DGR (2005SGR-00885), y la Swedish Alzheimer's Foundation por la financiación.

ABREVIATURAS

a.c.: *annulus crossings* (cruces del anillo donde se encontraba la plataforma en la PT)

AD: *Alzheimer's disease* (Enfermedad de Alzheimer)

Ad: cuadrante Adyacente derecho del MWM al de la plataforma

Ai: cuadrante Adyacente izquierdo del MWM al de la plataforma

ANOVA: Análisis de la varianza

ApoE: Apolipoproteína E

APP: Proteína precursora del amiloide

APP *wild-type*: APP normal

β A: péptido β -amiloide

BACE: *Beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme* (complejo proteico de actividad proteásica sobre la APP)

BDNF: *Brain-Derived Neurotrophic Factor* (factor neurotrófico)

BHB: *Boissier's 16-Holes Board* (Tabla de 16 agujeros de Boissier)

BPSD: *Behavioural and Psychological Simptoms of Dementia* (Síntomas Conductuales y Psicológicos de la Demencia).

CUE: Aprendizaje guiado por señales locales.

DLB: *Dark-Light Box* (Caja blanca-y-negra)

DMP: *Delayed matching-to-place* (Emparejamiento retardado a una posición)

EA: Enriquecimiento Ambiental

EA-PM: *PM enclosed arms* (brazos cerrados del PM)

HB: *Hole Board* (Test de la Tabla de agujeros)

HPA: *Hypothalamic-pituitary-adrenal axis* (Eje hipotalámico-pituitario-adrenal)

IA: *Inhibitory avoidance* (tarea de evitación inhibitoria)

Knock in: gen inducido

Knock out: gen silenciado

LTP: *Long Term Potentiation* (Potenciación a largo plazo)

MANOVA: Análisis de la varianza de medidas repetidas

MCI: *Mild Cognitive Impairment* (Deterioro cognitivo leve)

MWM: *Morris Water Maze* (Laberinto acuático de Morris)

NGF: *Nerve Growth Factor* (factor de crecimiento nervioso)

NFT: *Neurofibrillary Tangles* (Ovillos neurofibrilares de Tau)

NT: *Neurotrophin* (Neurotofina)

O: cuadrante Opuesto del MWM al de la plataforma

OA-PM: *PM open arms* (brazos abiertos del PM)

OF: *Open Field* (Campo abierto)

OR: *Object recognition* (Prueba de reconocimiento de objetos)

P: cuadrante "P" del MWM, donde se halla la Plataforma

PET: Tomografía de emisión de positrones

PM: *Plus Maze* (Laberinto en cruz elevado)

PS1: Presenilina 1

PS2: Presenilina 2

PT: *Place task* (Tarea de aprendizaje espacial de referencia)

RAWM: *Radial arm water maze* (Laberinto acuático de brazos radiales)

RM: *Removal* (Test de memoria sin plataforma)

ROS: *Reactive Oxygen Species* (Especies Reactivas del oxígeno)

SAM: *Senescence accelerated mouse* (ratón de de senectud acelerada)

SMT: Pruebas sensorio-motoras

VEGF: *Vascular Endothelial Growth Factor* (factor de crecimiento endotelial vascular)

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	
2.1. LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER: INTRODUCCIÓN GENERAL	5
2.2. ASPECTOS NEUROPATOLÓGICOS Y SINTOMATOLÓGICOS DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	7
2.2.1. Sintomatología del AD	8
2.2.2. Neuropatología del AD	9
2.2.2.1. El papel de la β A	12
2.2.2.2. El papel de la Tau	15
2.2.2.3. Alteraciones genéticas	17
Apolipoproteína E	18
Presenilinas	19
2.2.2.4. Recapitulación y resumen: La hipótesis actual sobre las interacciones de los mecanismos neuropatológicos que causan el AD	21
2.3. MODELADO DE LA SINTOMATOLOGÍA Y NEUROPATOLOGÍA DEL AD EN RATONES	23
2.3.1. Estudios en animales	23
2.3.1.1. Modelado de las características fenotípicas del AD	27
2.3.2. El modelo 3xTgAD	28
2.4. FACTORES AMBIENTALES QUE INFLUENCIAN EL RIESGO DE SUFRIR AD.....	31
2.4.1. El ejercicio físico	33
2.4.2. La dieta	33
2.4.3. La actividad intelectual	36

2.5. ¿QUÉ ES EL ENRIQUECIMIENTO AMBIENTAL?	37
2.5.1. Historia y efectos principales del EA en roedores	40
2.5.2. Efectos del EA en roedores <i>wild-type</i>	41
2.5.2.1. Cambios morfológicos	42
2.5.2.2. Cambios celulares y neuroquímicos	43
2.5.2.3. Cambios conductuales	46
Aprendizaje y memoria	46
Actividad espontánea, exploración y temerosidad	48
2.5.3. Efectos del EA en roedores transgénicos con AD	51
2.5.3.1. Efectos sobre la conducta: cognición y temerosidad	52
2.5.3.2. Efectos sobre la neurogénesis	56
2.5.3.3. Efectos sobre la patología amiloide	57

3. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

3.1. PLANTEAMIENTO	67
3.2. OBJETIVOS	71
3.2.1. Estudio I	71
3.2.2. Estudio II	72
3.3. HIPÓTESIS	73

4. ESTUDIO I

Caracterización del perfil cognitivo y BPSD en estadios iniciales del AD, en ratones 3xTgAD de 2.5 y 6 meses de edad

4.1. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1.1. Sujetos experimentales	79
4.1.2. Estudios conductuales	80
4.1.2.1. Laberinto acuático de Morris	82
4.1.2.2. Campo abierto	85
4.1.2.3. Laberinto en cruz elevado	86
4.1.2.4. Tabla de 16 agujeros de Boissier	87
4.1.2.5. Caja blanca-y-negra	88
4.1.3. Análisis estadísticos	89

4.2. RESULTADOS ESTUDIO I

Caracterización del perfil cognitivo y de conducta exploratoria y temerosa en situaciones de novedad, en animales 3xTgAD de 2.5 y 6 meses de edad

4.2.1. Aprendizaje y memoria espacial en el MWM	90
4.2.1.2. 2.5 meses de edad	90
4.2.1.3. 6 meses de edad	92
4.2.2. Caracterización de la conducta exploratoria en situaciones de novedad utilizadas como medidas de temerosidad	
4.2.2.1. 2.5 meses de edad	96
Conducta en el test del Campo abierto	96
Conducta en el Laberinto en cruz elevado	97
Conducta en la “Tabla de 16 agujeros de Boissier”	98
Conducta en la Caja blanca-y-negra	100
4.2.2.2. 6 meses de edad	101
Conducta en el test del Campo abierto	101
Conducta en el Laberinto en cruz elevado	103
Conducta en la “Tabla de 16 agujeros de Boissier”	104
Conducta en la Caja blanca-y-negra	105

4.3. DISCUSIÓN ESTUDIO I

4.3.1. Caracterización del perfil cognitivo de aprendizaje y memoria en ratones 3xTgAD de 2.5 y 6 meses de edad	106
4.3.2. Caracterización del perfil de alteraciones emocionales y conductuales, no esencialmente cognitivo, (BPSD) en ratones 3xTgAD de 2.5 y 6 meses de edad	110
4.3.3. Recapitulación sobre el Estudio I	116

4.4. CONCLUSIONES ESTUDIO I

119

5. ESTUDIO II

Caracterización del perfil cognitivo y BPSD en estadios avanzados del AD, en ratones 3xTgAD de 12 y 15 meses de edad. Efectos del enriquecimiento ambiental

5.1. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1.1. Sujetos experimentales	123
5.1.2. Tratamiento de enriquecimiento ambiental	125
5.1.3. Estudios conductuales	128
5.1.3.1. Pruebas sensorio-motoras	128
5.1.3.2. Campo abierto	131
5.1.3.3. Caja blanca-y-negra	132
5.1.3.4. Tabla de agujeros	133
5.1.3.5. Laberinto acuático de Morris	135
5.1.4. Análisis estadísticos	141

5.2. RESULTADOS ESTUDIO II

Caracterización del perfil cognitivo y de conducta exploratoria y ansiosa en situaciones de novedad, en animales de 12 y 15 meses de edad. Efectos del enriquecimiento ambiental

5.2.1. 12 meses de edad	142
5.2.1.1. Pruebas de resistencia física, Test del reflejo visual y Test de las esquinas	142
5.2.1.2. Conducta en el test del Campo abierto	145
5.2.1.3. Conducta en la Caja blanca-y-negra	150
5.2.1.4. Conducta en la Tabla de agujeros	155
5.2.1.5. Laberinto acuático de Morris Tarea de aprendizaje/memoria espacial de referencia	159
<i>Tarea de aprendizaje/memoria espacial en machos</i>	163
<i>Tarea de aprendizaje/memoria espacial en hembras</i>	166
Sesión de memoria sin plataforma a la 1h30	168

Prueba de “emparejamiento retardado -15s- a una posición”	170
<i>Prueba de DMP-15s en machos</i>	173
<i>Prueba de DMP-15s en hembras</i>	175
Prueba de “emparejamiento retardado -20min- a una posición”	177
Aprendizaje guiado por señales locales	180
5.2.2. 15 meses de edad	182
5.2.2.1. Pruebas de resistencia física, Test del reflejo visual y Test de las esquinas	182
5.2.2.2. Conducta en el test del Campo abierto	186
5.2.2.3. Laberinto acuático de Morris	
Tarea de aprendizaje/memoria espacial de referencia	194
<i>Tarea de aprendizaje/memoria espacial en machos</i>	199
<i>Tarea de aprendizaje/memoria espacial en hembras</i>	202
Sesión de memoria sin plataforma a la 1h30	204
Prueba de “emparejamiento retardado -15s- a una posición”	207
<i>Prueba de DMP-15s en machos</i>	210
<i>Prueba de DMP-15s en hembras</i>	212
Aprendizaje guiado por señales locales	214
5.2.2.4. Curva de supervivencia	215

5.3. DISCUSIÓN ESTUDIO II

5.3.1. Caracterización del perfil de conducta exploratoria y ansiosa en situaciones de novedad (BPSD), en ratones 3xTgAD de 12 y 15 meses	218
5.3.1.1. Funciones sensorio-motoras y peso corporal	220
5.3.1.2. Efectos del genotipo en conducta de ansiedad/ temerosidad, inhibición conductual y “curiosidad” (búsqueda de novedad).....	222

5.3.1.3. Efectos del enriquecimiento ambiental sobre la reactividad emocional y conducta exploratoria en situaciones de novedad	228
5.3.2. Caracterización del perfil cognitivo de aprendizaje y memoria espacial	233
5.3.2.1. Efectos del genotipo a los 12 y 15 meses de edad	235
Déficit de aprendizaje y memoria de referencia en los ratones 3xTgAD	235
Déficits de memoria de trabajo y a corto plazo en los ratones 3xTgAD	237
Memoria o/y “transferencia” a largo plazo entre los 12 y 15 meses: Habitación en el Campo abierto y transferencia de información a largo plazo en el MWM	240
“Aprendizaje guiado por señales” normal en 3xTgAD de 12 meses	242
5.3.2.2. Diferencias sexuales en el AD	243
Influencia de las hormonas sexuales y de respuesta al estrés en la cognición de 3xTgAD	249
5.3.2.3. Efectos del tratamiento de EA sobre la cognición	252
Efectos del EA de mejora de los déficits de aprendizaje y memoria	252
Efectos del EA sobre la “transferencia” de información entre el entrenamiento a los 12 meses y las tareas de los 15 meses	260
¿El EA mejora las capacidades cognitivas en modelos de ratón de AD mediante la disminución de la carga amiloide?	262
5.3.3. Curva de supervivencia	266

5.4. CONCLUSIONES ESTUDIO II	271
6. RECAPITULACIÓN: APORTACIONES Y LIMITACIONES DEL ESTUDIO	277
7. CONCLUSIONES GENERALES	285
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	291
9. ANEXO	351

1. RESUMEN

La enfermedad de Alzheimer (AD) es un desorden neurodegenerativo relacionado con la edad que representa la causa de demencia senil más común. Su prevalencia está aumentando de forma dramática paralelamente a la esperanza de vida y el envejecimiento social, convirtiéndose en la enfermedad neuropsiquiátrica con mayor coste socio-sanitario. Este desorden se caracteriza por la pérdida de memoria acelerada e incrementada respecto al envejecimiento normal, y el deterioro de otras habilidades cognitivas que interfieren con el estado de ánimo, la razón, el juicio y el lenguaje.

Actualmente, para el estudio de la enfermedad existen varios modelos animales que reproducen los principales marcadores patológicos del desorden: las placas extracelulares de β -amiloide (β A) y los ovillos neurofibrilares de proteína Tau. Este es el caso del modelo de ratón triple transgénico 3xTgAD, portador de los transgenes humanos PS1_{M146V}, APP_{Swe} y Tau_{P301L}, que desarrolla de manera progresiva las patologías β A y Tau, con un perfil temporal y anatómico específico que reproduce el patrón que tiene lugar en el cerebro humano con Alzheimer. El modelo 3xTgAD muestra alteraciones del perfil neuropatológico y cognitivo características de la enfermedad, de manera progresiva y en paralelo a lo que sucede en el cerebro de pacientes con AD, presentando placas de β A ampliamente extendidas tanto en la corteza como en el hipocampo a los 12 meses de edad, y ovillos intraneuronales de Tau a partir de los 15 meses.

Por otra parte, diversos trabajos han demostrado que el tratamiento de enriquecimiento ambiental en ratones es capaz de inducir cambios conductuales y de reactividad emocional frente al estrés, incrementar las capacidades de aprendizaje y memoria de los animales, incrementar la neurogénesis, y regular positivamente la expresión de factores neurotróficos

como en BDNF y el NGF. Se cree que la estimulación cognitiva aumenta la conectividad neuronal en áreas responsables del aprendizaje y la memoria, creando una reserva cognitiva, de manera que los animales enriquecidos desarrollan redes neuronales más fuertes y que, por tanto, pueden soportar un mayor número de daños antes de mostrar signos de declive.

Basándonos en estas teorías, la presente Tesis tiene como objetivos:

1. *La caracterización conductual del modelo de ratón 3xTgAD en diversas etapas del desarrollo de la neuropatología.* Confirmando y extendiendo el conocimiento sobre las alteraciones del perfil cognitivo (de aprendizaje y memoria espacial), y ampliándolo con la caracterización de las alteraciones a nivel no cognitivo o de reactividad emocional del modelo. Para realizarlo se llevó a cabo un estudio de caracterización de los ratones machos 3xTgAD, en las etapas tempranas del AD, a los 2.5 y 6 meses de edad (Estudio I). Y un estudio longitudinal en las etapas más avanzadas de la enfermedad, cuando las placas de βA y los ovillos de Tau ya están ampliamente extendidos por la corteza y el hipocampo, a los 12 y 15 meses de ratones 3xTgAD de ambos sexos (Estudio II).
2. *El estudio de los efectos presumiblemente beneficiosos del enriquecimiento ambiental (estimulación cognitiva, física y social) en el modelo 3xTgAD.* Para dicho estudio se realizó un tratamiento de enriquecimiento ambiental a los 6 meses de edad, de 5.5 meses de duración, con la posterior evaluación conductual de los animales 3xTgAD de ambos sexos a los 12 y 15 meses de edad (Estudio II).

Los resultados obtenidos muestran, por primera vez a los 2.5 meses de edad (en las fases iniciales de acumulación intraneuronal de la βA), que los ratones 3xTgAD presentan leves déficits cognitivos, detectados en la memoria espacial a corto plazo en el test del Laberinto acuático de Morris. Dicho déficit cognitivo

va acompañado de una ligera alteración a nivel no cognitivo/emocional, reflejada por una reducción en los niveles de actividad exploratoria en el test del Campo abierto, probablemente resultado de un incremento del nivel de ansiedad/temerosidad (como demuestran el número de defecaciones en diversas pruebas). A los 6 meses, cuando ya se detectan depósitos amiloides extracelulares difusos por la corteza, dichas alteraciones cognitivas (de aprendizaje y memoria espacial) y emocionales (de los niveles de ansiedad/temerosidad) se ven incrementadas en los ratones 3xTgAD.

Los resultados obtenidos a edades más avanzadas indican que los ratones 3xTgAD no muestran déficits sensorio-motores. Los déficits cognitivos de aprendizaje y memoria espacial, de memoria de trabajo y a corto plazo, de *transferencia* de información entre las dos edades, y los mayores niveles de ansiedad/temerosidad, están presentes a los 12 y 15 meses del modelo 3xTgAD. Asimismo los ratones 3xTgAD presentan dimorfismo sexual, reflejado en mayores déficits cognitivos de las hembras respecto a los machos, y mayores niveles de inhibición conductual frente a la novedad de los machos respecto a las hembras.

El enriquecimiento ambiental ejerce efectos positivos, aunque moderados, principalmente de mejora de los déficits de aprendizaje y memoria de referencia, de memoria de trabajo y de *transferencia* de información entre ambas edades en los animales 3xTgAD de 12 meses. Dichos efectos del tratamiento de enriquecimiento ambiental varían en función del género de los ratones.

En conclusión, los resultados del presente trabajo replican y extienden los datos conductuales existentes en la literatura respecto a las fases iniciales y avanzadas de la neuropatología en el modelo de ratón 3xTgAD, reforzando la hipótesis de que la acumulación de β A intraneuronal podría ser un marcador primario en el deterioro del AD, y aportan nuevas evidencias sobre el perfil no

cognitivo y emocional de estos animales. Asimismo, el enriquecimiento ambiental aplicado en etapas en las que la acumulación intraneuronal de βA está ampliamente extendida por la corteza y el hipocampo (además de detectarse depósitos amiloides difusos por la corteza) ejerce efectos positivos, aunque moderados, sobre el deterioro cognitivo que muestran los ratones 3xTgAD en etapas más avanzadas de la neuropatología. De este modo se sugiere que, aunque el enriquecimiento ambiental influye de manera positiva en las alteraciones cognitivas que presenta el modelo 3xTgAD, los efectos son muy moderados, proponiéndose un inicio más temprano del tratamiento para obtener mayores efectos.

Introducción

2. INTRODUCCIÓN

2.1. LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER: INTRODUCCIÓN GENERAL

En las dos últimas décadas, la neurobiología del envejecimiento ha sido una de las áreas científicas que más se ha expandido. Muchos de los esfuerzos se han centrado en conocer cuáles son los mecanismos neuronales que constituyen el sustrato de los desórdenes neurodegenerativos relacionados con la edad, cuya prevalencia está aumentando de manera dramática paralelamente a la esperanza de vida y el envejecimiento de la población. Este es el caso de la enfermedad de Alzheimer (*Alzheimer's disease, AD*), descrita por vez primera por Alois Alzheimer en 1906, que constituye el desorden neurodegenerativo y causa de demencia senil más común, y es el objetivo de un extenso e importante cuerpo de investigación clínica y básica.

El Alzheimer familiar e idiopático representa el 40-50% de los casos de demencia de la población anciana mundial, y es la enfermedad neuropsiquiátrica con mayores costes socio-sanitarios. Un declive marcado de la memoria declarativa o episódica reciente (incapacidad de recordar experiencias recientes), es una de las características clínicas primarias invariables de la enfermedad (Artero *et al.*, 2003) y, por tanto, representa el objetivo principal del fenotipado conductual de los modelos animales de Alzheimer. El deterioro cognitivo progresivo, con déficits de atención, de función ejecutiva, de memoria semántica y de procedimiento, de orientación espacial y de lenguaje, parece ser relativamente lento comparado con el déficit en la memoria episódica reciente. Todas estas funciones empeoran progresivamente durante los estados más avanzados de la enfermedad (Beatty *et al.*, 1994, Hodges *et al.* 1992, Perry y Hodges, 1999).

Como veremos en los próximos apartados, los avances en la tecnología de transgenes (transgénica), así como la investigación genética de la forma familiar precoz y de los factores genéticos de riesgo en los casos esporádicos de AD, han sido críticos para establecer modelos animales que reproducen los principales marcadores neuropatológicos de la enfermedad de Alzheimer: las placas extracelulares de β -amiloide (β A) y los ovillos neurofibrilares de proteína Tau (p. ej. Giménez-Llort *et al.*, 2007; Mattson, 2004; Morrissette *et al.*, 2009; Reitz *et al.*, 2011).

Abundan las revisiones que se han consagrado a resumir el nivel de conocimiento que se tiene sobre el cerebro envejecido y la neurodegeneración, tanto normal como patológica, así como en relación a la contribución que el desarrollo de modelos animales transgénicos para el AD ha supuesto en la investigación de los mecanismos neurobiológicos de la enfermedad (p. ej. Giménez-Llort *et al.*, 2007; Morrissette *et al.*, 2009; Wirths y Bayer, 2010). No obstante, los síntomas clínicos en humanos, que incluyen pérdida de memoria y deterioro de otras habilidades cognitivas que interfieren en el estado de ánimo, la razón, el juicio y el lenguaje, no siempre han encontrado su paralelismo en los modelos animales para esta enfermedad. La literatura relevante muestra el desafío que ha supuesto modelar los síntomas conductuales y alteraciones neuronales de esta enfermedad neurodegenerativa en roedores, pues todavía hoy algunos fenotipos neuronales como la disfunción sináptica y la pérdida sináptica son escasamente mimetizados, y muchos de los modelos animales con los que se ha trabajado hasta ahora tienen un valor predictivo pobre para evaluar el conjunto de neuropatologías (pues modelan principalmente las placas extracelulares de β A). La distancia entre las características clínicas de esta enfermedad progresiva y su inducción en modelos murinos basados en la tecnología de transferencia génica está desapareciendo poco a poco, pero para algunas conductas que son particularmente distintivas de los humanos con AD podría ser difícil establecer un paralelismo en roedores. Este es el caso de los síntomas neuropsiquiátricos

de la demencia (*Behavioral and Psychological Symptoms of Dementia, BPSD*) que, de hecho, son la fuente más importante de carga para los cuidadores, y que recientemente han adquirido el suficiente peso social para iniciarse su estudio en dichos modelos muridos (p. ej. Giménez-Llort et al., 2007).

Además de eso, tal y como se muestra en el presente trabajo, los nuevos modelos muridos también son cruciales para valorar la efectividad de nuevos planteamientos preventivos o terapéuticos previos al inicio de los ensayos clínicos con humanos. Las últimas guías de referencia que intentan definir criterios para mejorar los actuales y futuros modelos animales para el Alzheimer esporádico, sugieren que estos modelos animales transgénicos tienen que cumplir 3 requisitos (p. ej. Janus y Westaway, 2001): **i)** mostrar la neuropatología del AD de manera temporalmente progresiva, **ii)** mostrar los déficits cognitivos característicos de la enfermedad y, finalmente, **iii)** que los resultados obtenidos en las pruebas conductuales puedan ser verificados por diversos laboratorios.

Los aspectos neuropatológicos más específicos, la sintomatología y los déficits, así como los modelos animales más utilizados, serán objeto de discusión pormenorizada en las secciones siguientes de esta tesis.

2.2. ASPECTOS NEUROPATOLÓGICOS Y SINTOMATOLÓGICOS DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

La enfermedad de Alzheimer (*Alzheimer's disease, AD*) es un desorden neurodegenerativo que actualmente afecta cerca del 2% de la población de los países industrializados. El riesgo de sufrir la enfermedad aumenta de manera dramática a partir de los 70 años de edad, y se prevé que se triplique en los próximos 50 años (<http://www.alz.org>).

Las regiones cerebrales implicadas en los procesos de aprendizaje y memoria, incluyendo el lóbulo frontal y los lóbulos temporales entre otros, reducen su tamaño en pacientes con AD como resultado de la degeneración de las sinapsis y la muerte neuronal. Debido a que puede haber otras causas de muerte neuronal, el diagnóstico definitivo de la enfermedad de Alzheimer requiere un examen post mórtem del cerebro, y la demostración de un número suficiente de “placas” y “ovillos” con tal de calificarlo como “afectado” por AD (p. ej. Braak *et al.*, 1998; Dickson *et al.*, 1995).

2.2.1. Sintomatología del AD

La mayor parte de la investigación sobre el AD se centra en las características neuropatológicas y moleculares de la enfermedad, así como en los déficits cognitivos característicos. No obstante, los síntomas neuropsiquiátricos de la demencia tienen una importante prevalencia entre los pacientes y, de hecho, generan un profundo impacto en la calidad de vida de los pacientes y cuidadores, para los que supone una carga física y psicológica a menudo dramática (Shin *et al.*, 2005; Tan *et al.*, 2005). De modo que, con frecuencia todo ello resulta en la institucionalización de los enfermos (Hope *et al.*, 1998). Paranoia, alucinaciones, alteraciones de la actividad, agresividad, cambios del ritmo diurno (circadiano), alteraciones afectivas, ansiedad y fobias son los siete dominios distinguidos por las escalas de evaluación conductual a nivel clínico (Reisberg *et al.*, 1987), y son habitualmente denominadas “Síntomas conductuales y psicológicos de la demencia (*Behavioral and Psychological Symptoms of Dementia*, BPSD)”. Si modelar la pérdida progresiva de memoria característica del AD en ratones transgénicos ha sido un desafío, estudiar la validez de estos modelos respecto a los síntomas no cognitivos (BPSD) todavía permanece como un objetivo a lograr. En este esfuerzo, anomalías neuroconductuales como la neofobia, estados epilépticos, y el incremento de la

agresividad o la actividad locomotora han sido ya descritos en diversos ratones transgénicos (ver ej. Auld *et al.*, 2002; Janus y Westway, 2001), aunque todavía hoy el modelado de los BPSD constituye un desafío para el estudio de la enfermedad en modelos de laboratorio.

2.2.2. Neuropatología del AD

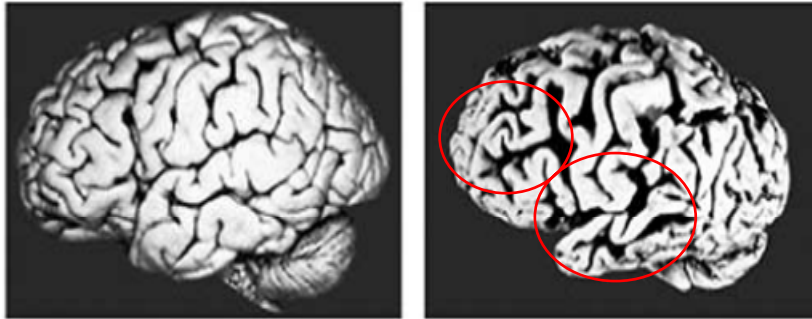
Los estudios post mórtem realizados en pacientes con la enfermedad de Alzheimer muestran, como característica principal, la presencia de placas de proteína β -amiloide en el cerebro, concretamente en la corteza cerebral e hipocampo. Asimismo, también se ha podido observar la presencia de ovillos intraneuronales de proteína Tau hiperfosforilada en las mismas estructuras cerebrales.

Las placas consisten en depósitos extracelulares de fibras y agregados amorfos del péptido β -amiloide, y también se detectan en gran número depósitos difusos de β A. Los ovillos neurofibrilares son agregados fibrilares intracelulares de la proteína Tau asociada a microtúbulos, cuya forma alterada exhibe hiperfosforilación y modificaciones resultantes de su oxidación.

Las placas y los ovillos están presentes principalmente en regiones cerebrales implicadas en el aprendizaje, la memoria y en procesos emocionales, como son la corteza cerebral, el hipocampo, el cerebro anterior basal y la amígdala. Las regiones cerebrales con placas de β A exhiben una reducción del número de sinapsis, y las neuritas asociadas a las placas se ven dañadas a menudo, sugiriendo que la proteína β A daña las sinapsis y las neuritas. Las neuronas que usan glutamato o acetilcolina como neurotransmisores se ven particularmente afectadas, aunque las neuronas que producen serotonina y

norepinefrina también se ven dañadas (Hémar y Muller, 2011; LaFerla *et al.*, 2005; Querfurth y LaFerla, 2010; Mattson, 2004).

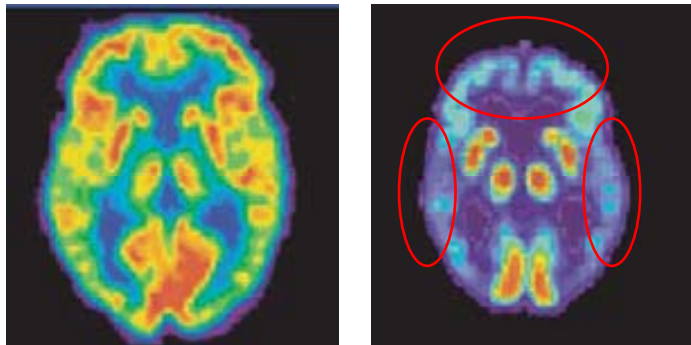
a)



Cerebro control

Cerebro con AD

b)



Cerebro sano

Cerebro con AD

Figura 2.1.- **a)** Comparado en con el cerebro de una persona sana, el cerebro de un paciente con AD presenta un encogimiento de los giros del lóbulo temporal (parte inferior del cerebro en la fotografía) y lóbulo frontal (parte izquierda del cerebro en la fotografía) (tomada de Mattson, 2004). **b)** En la tomografía de emisión de positrones (PET) las imágenes muestran el consumo de glucosa (el rojo y amarillo indican un consumo elevado de los niveles de glucosa) en una persona viva sana y un sujeto control normal. El paciente con Alzheimer muestra una importante disminución de la energía metabólica en la corteza frontal (parte superior del cerebro en la fotografía) y los lóbulos temporales (laterales del cerebro en la fotografía) (tomada de Mattson, 2004).

La característica principal de la enfermedad es la alteración proteolítica del procesamiento de la proteína precursora de la amiloide (APP) (proteína codificada en el cromosoma 21), dando como resultado la producción y la agregación de formas neurotóxicas de la β A. Las neuronas que degeneran en el AD muestran un incremento del daño oxidativo, un empeoramiento del metabolismo energético y una alteración celular de la homeostasis del calcio. La β A parece ser un importante instigador de estas anomalías (Mattson, 2004).

Como consecuencia de la alteración en el procesamiento de estos dos tipos de proteínas, la β A y la Tau, en la enfermedad de Alzheimer se producen una gran cantidad de cambios en la función cerebral. Estos comprenden: **i)** un incremento del estrés oxidativo celular (producción incontrolada de radicales libres del oxígeno que modifican proteínas, lípidos y DNA) con la consecuente alteración del metabolismo energético celular (Butterfield *et al*, 2001); **ii)** incapacidad de regular la homeostasis del calcio celular con la consiguiente disfunción y muerte celular (Gabuzda *et al*, 1994); **iii)** alteraciones sinápticas y axonales que afectan a diversas estructuras neuronales, como es el caso de circuitos implicados en el aprendizaje y la memoria (Farlow *et al*, 2002); **iv)** pérdida de neuronas en la corteza entorhinal (capa II), el hipocampo (región CA1), la corteza frontal y temporal (West *et al*, 1994), y, **v)** alteraciones de la glía (astrocitos, oligodendrocitos y microglía son células que juegan un papel importante en la respuesta del cerebro a heridas e infecciones) que acompañan las neuronas afectadas por el AD (McGeer y McGeer, 2002).

A pesar de todas estas alteraciones en el cerebro con Alzheimer, son las placas extracelulares de β A y los ovillos intraneuronales de proteína Tau hiperfosforilada las características histológicas principales que determinan el diagnóstico del cerebro con AD (p.ej. Querfurth y LaFerla, 2010). A continuación comentaremos más detalladamente el papel de estas dos proteínas con aparente papel decisivo en la enfermedad de Alzheimer.

2.2.2.1. El papel de la β A

Como ya se ha comentado previamente, las placas seniles, también denominadas placas amiloideas, consisten en depósitos extracelulares insolubles (péptidos de 39-43 aminoácidos de longitud), llamados β -amiloides (β A) (Meyer-Luehmann *et al.*, 2003), que son producto de la degradación de una proteína mayor, denominada proteína precursora de la amiloide (APP).

La APP es una proteína integral de membrana, con un único dominio intermembrana, que se expresa de forma amplia en las células de todo el cuerpo, donde la cantidad producida viene influenciada por el desarrollo y el estado fisiológico de las células. Las funciones normales de la APP no son todavía completamente conocidas, pero diversos estudios sugieren que tiene un papel importante en la regulación de la supervivencia neuronal, el crecimiento de las neuritas, la plasticidad sináptica y la adhesión celular (Mattson y Guo, 1997), así como en la reparación de las neuronas (Priller *et al.*, 2006; Turner *et al.*, 2003). Otra de las posibles funciones que se cree que puede tener la APP de longitud completa es la de receptor de superficie celular, que traduce señales dentro de la célula en respuesta a un ligando extracelular (Kimberly *et al.*, 2001). Sin embargo, ni un ligando, ni la cascada de señalización que desencadenaría la APP han sido claramente establecidos.

El metabolismo correcto o alterado de la APP será el responsable de la formación de péptidos solubles (como son el sAPP α y sAPP β) o de fragmentos insolubles (es el caso del péptido β A), respectivamente, resultantes de la fragmentación de la esta proteína (Mattson, 2004). Así, la APP puede ser fragmentada por acción de la α -secretasa seguida de la acción de la γ -secretasa, de manera que se generan fragmentos solubles de APP (LaFerla *et al.*, 2007; Mattson, 2004). Sin embargo, cuando sobre la APP actúa en primer lugar la β -secretasa (o complejo BACE) seguida de la acción de la γ -secretasa, se liberan

los fragmentos de βA_{1-40} y βA_{1-42} dando lugar a un nuevo péptido extracelular insoluble (Mattson, 2004; Querfurth y LaFerla, 2010). Dicho péptido iniciará la ruta amiloidogénica, formado agregados extraneuronales insolubles que constituirán las placas seniles y acumulándose en las paredes arteriales de medio calibre, dando origen a la angiopatía amiloide (Querfurth y LaFerla, 2010) (véase Figura 2.2.).

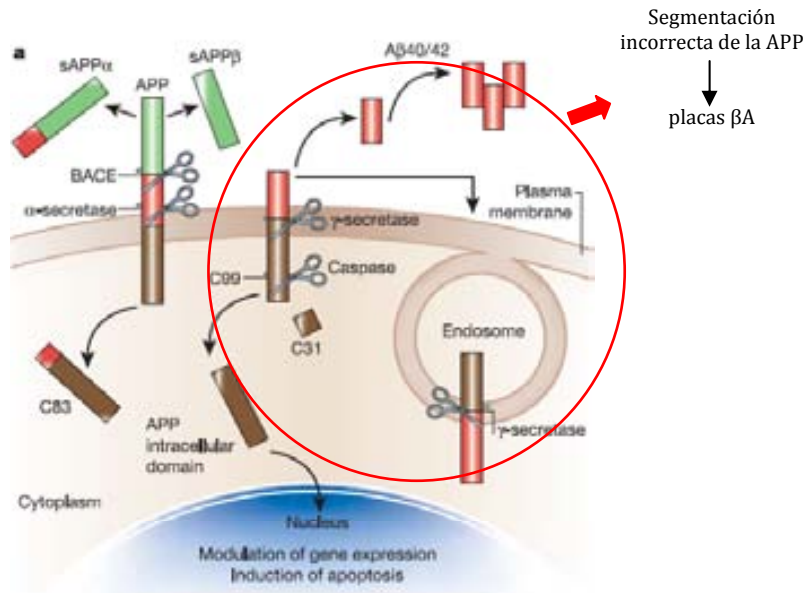


Figura 2.2.- Metabolismo de la APP. En el lado izquierdo de la Figura vemos como sería el correcto procesamiento de la proteína APP, dando lugar a fragmentos solubles de APP. Por el contrario, en lado derecho vemos como sería una fragmentación alterada de la APP, produciéndose como resultado el péptido insoluble βA que con su progresiva acumulación originaría las placas seniles características de la enfermedad de Alzheimer (Mattson, 2004).

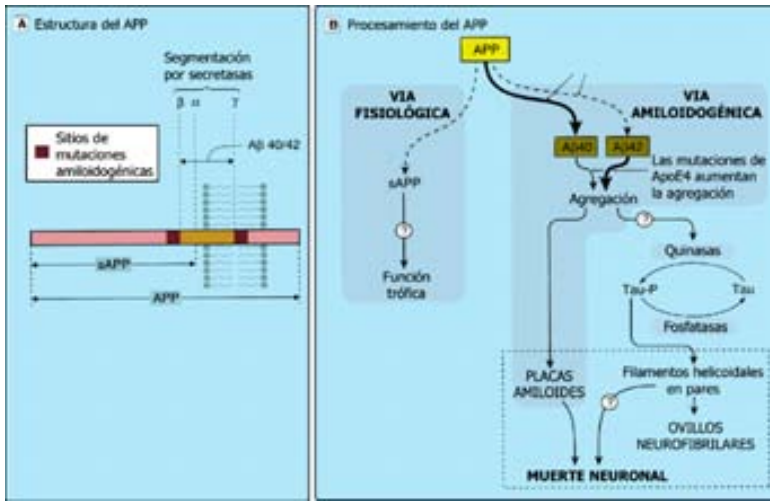


Figura 2.3.- **A)** Posibles lugares de fragmentación de la APP, con los consecuentes péptidos resultantes. **B)** “Cascada de la β -amiloide”: alteraciones celulares producidas por el acumulo de las formas insolubles del péptido β A.

Por otro lado, diversos estudios indican que la β A podría ser más tóxica cuando se encuentra en forma de oligómero soluble en los estadios tempranos de la agregación (Kayed *et al.*, 2003; Lambert *et al.*, 1998). Las sinapsis a su vez, podrían ser particularmente susceptibles a los efectos adversos de las formas agregadas de la β A, como es sugerido por la habilidad de la β A para empeorar los transportadores de iones y glucosa y por los estudios electrofisiológicos que demuestran que la β A empeora la plasticidad sináptica (Chapman *et al.*, 1999; Mattson y Guo, 1997).

La β A podría dañar las neuronas mediante la inducción de estrés oxidativo (Boyd-Kimball, 2005; Cruz-Sánchez *et al.*, 2010), la disrupción de la homeostasis celular del calcio (Green y LaFerla, 2008; Mattson y Guo, 1997) y el desencadenamiento de los procesos inflamatorios (Eikelenboom *et al.*, 2006; Querfurth y LaFerla, 2010). Coincidiendo con el incremento en la producción de β A en el AD, hay una disminución de la cantidad de sAPPa producido, que podría contribuir al deceso de neuronas, ya que se sabe que la sAPPa incrementa la resistencia de las neuronas a agresiones oxidativas y

metabólicas (Mattson y Guo, 1997). En ratones mutantes para la APP, los déficits de memoria aparecen relativamente temprano en el proceso de deposición del β A, de manera consistente con los efectos neurotóxicos del β A que tienen lugar durante la formación de oligómeros del péptido (Koistinaho *et al.*, 2001). Sumado a la evidencia de que la deposición de β A es un evento fundamental en el AD, debe remarcarse el hecho de que la inmunización (“vacunación”) de ratones transgénicos para el AD, da como resultado la eliminación de los depósitos de β A del cerebro (Oddo *et al.*, 2004; Schenk *et al.*, 1999), hecho que puede resultar en la reversión de los déficits cognitivos (Morgan *et al.*, 2000).

Resumiendo, el péptido β A estimularía el aumento de calcio intracelular (Green y LaFerla, 2008; Mattson y Guo, 1997), la citotoxicidad por calcio, y provocando además (mediante esta movilización del calcio), la fosforilación de la proteína Tau, dando lugar sucesivamente a la formación de los ovillos neurofibrilares y en última instancia a la muerte neuronal (LaFerla, 2010; Oddo *et al.*, 2007 y 2009; Querfurth y LaFerla, 2010). De este modo, la cadena de sucesos desencadenados por la acumulación del péptido β A es consistente con la hipótesis de la “cascada amiloide”, y puede explicar además por qué los desórdenes exclusivos de Tau no van acompañados de la patología amiloide (Oddo *et al.*, 2007 y 2009) (ver Fig. 2.3.).

2.2.2.2. El papel de la Tau

La proteína Tau tiene la función, mediante su fosforilación, de promover el montaje y estabilización de los microtúbulos neuronales y vesículas de transporte. Los microtúbulos son polímeros que forman parte del citoesqueleto neuronal, imprescindibles para mantener la dinámica del

citoplasma en los procesos de transporte en el interior de la neurona y en la formación del huso mitótico en células en división (Hernández y Ávila, 2007).

La alteración de la función de la Tau en la enfermedad de Alzheimer es debida a una hiperfosforilación de esta proteína, que impide su correcto plegamiento, dando lugar a una proteína insoluble que presenta falta de afinidad por los microtúbulos y se auto-asocia formando pares de estructuras filamentosas helicoidales. Es decir, este cambio en su estructura da lugar a una proteína aberrante, incapaz de formar los polímeros intracelulares que debería, y provocando a su vez la desestabilización del citoesqueleto neuronal, que conlleva posteriormente la desintegración del sistema de transporte de la neurona. Los enzimas que añaden y aquellos que eliminan los residuos de fosfato, son los que regulan la extensión de la fosforilación de la Tau (Iqbal *et al.*, 2005).

Estos polímeros de Tau hiperfosforilada se organizan en estructuras helicoidales altamente resistentes, formando los denominados ovillos neurofibrilares (*Neurofibrillary Tangles*, NFT). Estos ovillos filamentosos anómalos provocan serios trastornos en la actividad celular, llevando a la neurona a una pérdida de la capacidad de transmitir mensajes nerviosos y, finalmente, al proceso neurodegenerativo (Ding y Johnson, 2008; Xie *et al.*, 1998).

Estos ovillos de Tau, además de formarse durante el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer, los encontramos también en otros desórdenes degenerativos llamados taupatías (Lee *et al.*, 2001). El número de ovillos neurofibrilares es un marcador patológico de la severidad de la enfermedad de Alzheimer. Y, de igual modo a lo que sucede con los oligómeros de βA , los agregados intermedios de las moléculas de Tau anormales son citotóxicos (Khlitunova *et al.*, 2006) y empeoran los procesos cognitivos (Oddo *et al.*, 2006a; Santacruz *et al.*, 2005).

Las mutaciones de la Tau no ocurren en la enfermedad de Alzheimer, y la extensión de la pérdida neuronal está fuera de proporción respecto al número de ovillos neurofibrilares (Gómez-Isla *et al.*, 1997). Sin embargo, los niveles elevados de Tau hiperfosforilada total en el fluido cerebrospinal correlaciona con las reducciones en los resultados de los exámenes cognitivos en pacientes con AD (Wallin *et al.*, 2006). Las evidencias experimentales indican que la acumulación de β A precede y conduce hacia la agregación de la Tau (Lewis *et al.*, 2001; Oddo *et al.*, 2003a). Además, la degeneración inducida por β A en cultivos de neuronas y los déficits cognitivos en ratones usados como modelos de la enfermedad de Alzheimer, requieren la presencia de Tau endógena (Rapoport *et al.*, 2002; Roberson *et al.*, 2007).

Asimismo, el incremento del estrés oxidativo, el empeoramiento de la función de plegado de proteínas del retículo endoplasmático, y la deficiencia de la función autofágica de proteínas dañadas y de limpieza (mediada por el proteasoma), aceleran la acumulación de proteínas Tau y amiloides en la enfermedad de Alzheimer (Hoozemans *et al.*, 2005; López Salón *et al.*, 2000).

2.2.2.3. Alteraciones genéticas

La gran mayoría de casos de AD son esporádicos, es decir, no se transmiten de manera hereditaria. Sin embargo, los análisis genéticos moleculares sugieren que probablemente hay diversos genes que proporcionan susceptibilidad al AD. De este modo, los descubrimientos que han tenido lugar en los últimos 15 años sobre las aberraciones genéticas que pueden incrementar el riesgo de heredar el AD, han supuesto un avance en el conocimiento de las alteraciones genéticas y celulares responsables de la degeneración neuronal y de la disfunción cognitiva en el AD (Selkoe y Schenk, 2003). Los primeros estudios a nivel proteómico fueron dirigidos a determinar la secuencia de aminoácidos

del péptido β A. Posteriormente se logró localizar y clonar el gen que codifica la APP en el cromosoma 21. Además, diversas mutaciones para esta proteína fueron identificadas (Mattson, 2004). A partir de este avance en la genética de la enfermedad, ulteriores estudios hallaron diversas mutaciones para otras proteínas que conferirían un incremento en la predisposición a sufrir la enfermedad de Alzheimer.

Apolipoproteína E

El primer gen que fue identificado y propuesto como causante de susceptibilidad al AD fue la Apolipoproteína E. Se trata de una lipoproteína transportadora de colesterol, codificada en el cromosoma 19. Este gen presenta tres alelos que codifican tres isoformas diferentes de la Apolipoproteína E (ϵ 2, ϵ 3 y ϵ 4), y algunas de sus isoformas se consideran un factor de riesgo para sufrir AD (Hsiung *et al.*, 2004; Mattson, 2004). Las isoformas más frecuentes en la población son la ϵ 3, ϵ 2 y ϵ 4, presentes en el 80%, 5% y 15 % de la población respectivamente.

Los individuos que producen la isoforma ϵ 4 muestran un incremento del riesgo a sufrir AD (Roses, 1997). Se conoce que el polimorfismo ϵ 4 es más frecuente en la enfermedad de Alzheimer que en la población general, apareciendo en el 50 % de los pacientes con AD (Roses, 1994). Por el contrario, la presencia de la isoforma ϵ 2 parece que disminuye el riesgo de padecer la enfermedad de Alzheimer (Roses, 1997).

Los mecanismos por los que la ϵ 3 promueve el AD todavía no han sido establecidos, pero hay evidencias que indican que la ϵ 4 incrementa la agregación de β A y reduce su eliminación (Mattson, 2004). Además, los datos sugieren que la ϵ 4 puede incrementar el riesgo de AD mediante la estimulación

del proceso amiloidogénico de la APP, promoviendo la patología cerebrovascular, incrementando el estrés oxidativo y empeorando la plasticidad sináptica (Mattson, 2004).

Resumiendo, se ha observado que la Apo-E se encuentra en todas las estructuras afectadas por lesiones en la AD (placas seniles, ovillos neurofibrilares y depósitos de β A perivascular), pero se desconoce si su papel consiste en reforzar estas formaciones o bien facilitar el añadido de nuevas moléculas que favorezcan el crecimiento de estas estructuras anómalas (Waring y Rosenberg, 2008). Asimismo, también se ha observado que el colesterol influye en la actividad de las secretasas, las enzimas involucradas en el metabolismo de la proteína APP y en la producción de péptidos β -amiloide (Kuo *et al.*, 1998).

Presenilinas

Análisis posteriores identificaron una región del cromosoma 14 como otro locus donde se producían mutaciones relacionadas con el AD hereditario, y el gen que codifica la Presenilina-1 (PS1) fue identificado como el gen afectado (Sherrington *et al.*, 1995). Otras mutaciones en un gen del cromosoma 1, con una elevada homología con la PS1, nombrado Presenilina-2 (PS2), también se mostraron como causantes de algunos casos de AD hereditario (Levy-Lahad *et al.*, 1995).

Las presenilinas son proteínas de membrana que han sido propuestas como reguladoras del procesamiento de la proteína APP, al formar parte del complejo proteico de la γ -secretasa. Por otra parte, la γ -secretasa es un complejo enzimático que segmenta la APP en la región transmembrana. Este enzima incluye cuatro tipos diferentes de proteínas: Presenilina, Nicastrina,

Aph-1 y Pen-2. El sitio activo de la γ -secretasa requiere la actividad proteásica de la Presenilina 1, y la APP es solamente una de las diversas proteínas que la γ -secretasa segmenta (Mattson, 2004).

Como ya hemos comentado, la Preselinina-1 es una proteína transmembrana, que forma parte del complejo proteico de la γ -secretasa participando en la degradación de la APP. Como parte de la familia de las Presenilinas tiene muchas otras funciones. Entre ellas se encuentran, su participación en la apoptosis, además de tener un papel en la comunicación intercelular, a través del mantenimiento de las sinapsis. Se han descrito más de 50 mutaciones en la PS1 que producen AD familiar autosómico dominante, de inicio entre los 30 y 50 años de edad del paciente. Parece, por tanto, que las mutaciones en la PS1 son la causa más frecuente de Alzheimer hereditario. Sin embargo, aun se desconoce cuál es el proceso que inicia la enfermedad en pacientes con mutaciones de la PS1 (Hutton y Hardy, 1997).

Por otro lado, la Preselinina-2 (PS2) es una proteína transmembrana con una secuencia similar a la PS1, codificada por un gen localizado en el cromosoma 1. No se conoce bien la función de esta proteína, pero se han descrito 5 mutaciones en este gen que producen AD familiar en edades entre los 30 y 65 años (Hutton y Hardy, 1997).

Otro locus de susceptibilidad para el inicio tardío del AD ha sido localizado en el cromosoma 10, pero el gen responsable todavía no ha sido identificado (Tanzi *et al.*, 2001).

2.2.2.4. Recapitulación y resumen: La hipótesis actual sobre las interacciones de los mecanismos neuropatológicos que causan el AD

La anomalía que juega un papel fundamental en la disfunción y muerte de neuronas en el AD es la alteración del proceso proteolítico de la proteína APP, resultando en un incremento en la producción y acumulación de formas neurotóxicas de la βA en el cerebro, que conducen a una serie de alteraciones neuronales (incremento del daño oxidativo, empeoramiento del metabolismo energético y una alteración celular de la homeostasis del calcio). Además, hay evidencias de que la acumulación de βA conduce hacia la agregación de la Tau (Oddo *et al.*, 2003a; Lewis *et al.*, 2001), provocando serios trastornos en la actividad celular, impidiendo el proceso de transmisión nerviosa y conduciendo finalmente a la neurodegeneración neuronal (Ding y Johnson, 2008; Xie *et al.*, 1998). Esta cascada de acontecimientos iniciados por la acumulación del péptido amiloide es lo que llamamos la “hipótesis amiloide” (Hardy, 1997, Mattson, 2004). En cada caso de AD familiar de inicio temprano autosómico dominante, donde la anomalía genética ha sido identificada (pueden ser mutaciones en los genes de la APP, ApoE, PS1 y PS2), el gen defectuoso causa un incremento en la producción de la forma larga de la βA (la de 42 aminoácidos, o βA_{42}) en pacientes, en cultivos celulares y en ratones transgénicos (Haas *et al.*, 1995; Scheuner *et al.*, 1996).

Mutaciones en la APP causantes del AD familiar resultan en alteraciones de uno o dos aminoácidos dentro de (o inmediatamente adyacentes a) la βA , que incrementan su segmentación mediada por BACE y las γ -secretasas, mientras que las mutaciones en la Presenilina alteran la actividad de la γ -secretasa dando lugar al péptido insoluble βA tras la proteólisis de la APP (Hardy, 1997).

Las causas de la alteración del metabolismo de la APP y su deposición en los casos esporádicos de AD todavía no han sido desveladas, pero podrían incluir el aumento del estrés oxidativo relativo a la edad, el empeoramiento del metabolismo energético y la perturbación de la homeostasis celular iónica. La evidencia genética e histopatológica apoya el papel central del metabolismo alterado de la APP en la patogénesis del Alzheimer. Y asimismo, los hallazgos experimentales en cultivos celulares y modelos animales han identificado las consecuencias adversas del metabolismo alterado de la APP, consistente en su implicación en la disfunción sináptica y muerte de células nerviosas en el AD. El incremento en la deposición de la β A que tiene lugar en el AD, probablemente contribuye a la degeneración de las neuronas debido a que la β A puede ser directamente tóxica para las neuronas, así como puede incrementar su vulnerabilidad al estrés metabólico y oxidativo, y la excitotoxicidad (Mattson, 1997).

El incremento del estrés oxidativo (la producción incontrolada de radicales altamente reactivos del oxígeno) y el empeoramiento del metabolismo celular energético son características de muchas de las enfermedades relacionadas con la edad, y el AD no es una excepción. Las células de los cerebros de los pacientes con AD muestran, anómalamente, elevadas cantidades de proteínas, lípidos y DNA modificados por la oxidación. Este daño molecular mediado por radicales libres es particularmente prominente alrededor de las placas y de las neuronas que contienen ovillos neurofibrilares, sugiriendo un papel de estrés oxidativo en el daño neuronal mediado por la proteína amiloide y la patogénesis neurofibrilar (Butterfield, 2001).

2.3. MODELADO DE LA SINTOMATOLOGÍA Y NEUROPATOLOGÍA DEL AD EN RATONES

La evaluación en detalle del rango completo de características o alteraciones emocionales, cognitivas y conductuales de la demencia (los que llamamos síntomas BPSD) es extremadamente importante, debido a que las expresiones clínicas de los BPSD de pacientes con AD son heterogéneas. Diferentes tipos de síntomas pueden ser mejorados con la misma terapia farmacológica, y este es uno de los aspectos que ha hecho posible agrupar los síntomas en un número más reducido de categorías que ayudan a evaluar el comportamiento de los pacientes. Algunos estudios han aproximado las conexiones entre dominios cognitivos selectivos y otros síntomas conductuales mediante análisis factoriales (p. ej. Mirakhur *et al.*, 2004; Spalletta *et al.*, 2004,). Spalletta *et al.* (2004) encontraron que en un análisis de componentes principales las variables emocionales y cognitivas/conductuales se agrupaban en 7 factores, denominados “cognitivo-general”, “habilidades constructivas”, “hiperactividad”, “psicosis”, “ansiedad”, “estado de ánimo-excitable” y “estado de ánimo depresión/apatía”, y concluyeron que la cognición y otros aspectos conductuales son dimensiones independientes. Debido a esta complejidad y heterogeneidad en las manifestaciones clínicas de la neuropatología del Alzheimer, parece que modelar los déficits cognitivos, emocionales y conductuales en modelos animales no es tarea fácil.

2.3.1. Estudios en animales

Las patologías neurodegenerativas, y en especial la enfermedad de Alzheimer, debido a su creciente incidencia en los países desarrollados a causa del envejecimiento progresivo de la población, han sido objeto preferente en el diseño de modelos animales para su estudio. En el caso de la enfermedad de

Alzheimer, el objetivo principal se ha focalizado en el diseño de líneas múridas transgénicas que exhiban características fenotípicas análogas a las de las lesiones que caracterizan la enfermedad en humanos.

De este modo, para el estudio del AD, además de utilizarse algún modelo animal no transgénico como es el caso del ratón SAMP8 (que presenta senescencia neural y cognitiva acelerada; Butterfield *et al.*, 2005; Nomura *et al.*, 1999; Okuma *et al.*, 1998), la mayoría de estudios se han centrado en el uso de modelos simples y dobles transgénicos portadores de las mutaciones genéticas características de los pacientes con la enfermedad. Así, la profusión de líneas transgénicas que acarrearán una o varias de las anomalías genéticas/moleculares distintivas del AD, asociadas a los procesos de destrucción celular en el hipocampo, la corteza cerebral y otras regiones encefálicas, ha servido para refinar y complementar la hipótesis de la cascada amiloidea neurotóxica (p. ej. Bayer y Wirths, 2011; Codita *et al.*, 2006; Crews *et al.*, 2010; Giménez-Llort *et al.*, 2007; Tobeña y Fernández-Teruel, 2010; Schaeffer *et al.*, 2011; véase resumen de modelos transgénicos en Tabla 2.1.).

Antes de entrar en detalle en el desarrollo de los modelos animales transgénicos, cabe comentar que otras dos alternativas que también se han utilizado para el estudio del AD han sido los modelos *knock out* y las líneas celulares. En el caso de los animales *knock out*, se trata de modelos genéticos en los que se produce una inhibición del gen a estudiar, de modo que esto permite conocer más concretamente cuál es la función de la proteína que codifica dicho gen (p. ej. Wang *et al.*, 2011; Weyer *et al.*, 2011; Tobeña y Fernández-Teruel, 2010). En cuanto al estudio de la enfermedad mediante el uso de líneas celulares, el gen de la APP también ha sido transferido a modelos celulares, con la finalidad de inducir el incremento de la ratio $\beta A_{42}/\beta A_{40}$ por sobreproducción de la proteína (Borchelt *et al.*, 1996). Este exceso de APP puede ser suficiente para incrementar la secreción del péptido βA . Sin embargo, generalmente es

necesario que esta APP esté mutada para que produzca una cantidad suficiente de βA y en consecuencia los cambios sean visibles para el investigador.

De este modo, teniendo en cuenta las diversas técnicas posibles para el estudio de la enfermedad de Alzheimer, el uso de animales transgénicos supone una enorme ventaja, porque permite disponer de modelos murinos de bajo coste, fácilmente reproducibles, que expresan en sincronía determinadas alteraciones fenotípicas y genético/moleculares características del AD. Además, tales modelos permiten realizar caracterizaciones más completas de los nuevos tratamientos, que no serían posibles en otros modelos. Dichos análogos transgénicos son generalmente ratones, ratas o cobayas, a los que en las primeras fases del desarrollo embrionario se les introduce un gen (o parte de un gen) de otra especie, junto con una secuencia promotora de la expresión de dicho gen (ver por ej. Oddo *et al.*, 2003a). El diseño de modelos transgénicos para la enfermedad de Alzheimer se focalizó en un principio hacia la inclusión del gen APP humano normal en los modelos murinos, si bien con el tiempo la investigación ha derivado en la obtención de modelos transgénicos con otras mutaciones características de la enfermedad, como las del gen de la PS1, la PS2 e incluso de la proteína Tau. Además, mediante cruces entre animales transgénicos pueden producirse animales doblemente transgénicos, como sería el caso de los animales portadores de las mutaciones para APP y Presenilinas conjuntamente (Bizon *et al.*, 2007).

En la siguiente Tabla (2.1.) revisamos, resumidamente, los modelos animales transgénicos más ampliamente utilizados para el estudio de la neuropatología y psicobiología de la enfermedad de Alzheimer.

MODELO	BACKGROUND	PROMOTOR	TRANSGEN	REFERENCIA
Mutación APP				
PDAPP	Outbred Swiss-Webster crossed to (C57B6xDBA2)F1	PDGF- β chain gen	hAPP V717/F (Indiana mutation)	Games <i>et al.</i> , 1995
Tg2576(APP ₆₉₅ SWE)	Hybrid background: C57B/6J x SJL F2	Hamster PrP	hAPP 695 K670N/M671L (Swedish double mutation)	Hsiao <i>et al.</i> , 1996
Tg APP 23	Hybrid background: (C57B/6J x DBA2) x C57BL/6	Mouse Thy-1	hAPP 751 Swedish double mutation hAPP 695 V717/I	Sturchler- Pierrat <i>et al.</i> , 1997
APP Lo	FVB/N	Mouse Thy 1	(London)	Moechars <i>et al.</i> , 1999
Mutaciones combinadas APP				
Tg CRND 8	Hybrid background: (C3H/He x C57BL/6) x C57BL/6	Hamster PrP	hAPP 695 Swedish double mutation and Indiana	Janus <i>et al.</i> , 2001 Chishti <i>et al.</i> , 2001
J20 (APP Swe-Indi)	Hybrid background: C57BL/6 x DBA/2 F1	PDGF- β chain gen	hAPP 695 Swedish double mutation and Indiana	Mucke <i>et al.</i> , 2000
Tg APPArcSwe	Hybrid background: C57BL/6 x CBA F1	Mouse Thy 1	hAPP Swedish double mutation and Arctic	Lord <i>et al.</i> , 2006
Mutaciones Presenilina				
Human PS1 _{w1} rescue	Hybrid background: C57BL/6 x SJL	Mouse Thy 1	Human wild type PS1	Qian <i>et al.</i> , 1998
PS1 M146V	Swiss-Webster x (C57BL/6 x DBA/2) F1	Rat PDGF β chain	Human PS1 M146V	Duff <i>et al.</i> , 1996
Mutaciones APP y Presenilina				
APP751 ^{SL} /PS1KI	Hybrid: C57BL/6 50% CBA 25% - 129SV 25%	Thy 1	hAPP Swedish and London hPS1 knockin M233T/L235P	Casas <i>et al.</i> , 2004
Mutaciones Tau				
Tau P301L	Hybrid: C57BL/6, DBA/2 Swiss-Webster	Mouse Thy1.2	Human tau 40 with 4 repeats P301L mutation	Götz <i>et al.</i> , 2001
Triple transgenic mice				
3xTgAD	Hybrid background: 129/C57BL/6	Mouse Thy1.2	hAPP Swedish mutation Tau P301L PS1 M146V	Oddo <i>et al.</i> , 2003a

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

Tabla 2.1.- Resumen de los modelos de roedores transgénicos más utilizados como análogos de AD (extraído de Codita *et al.*, 2006).

2.3.1.1. Modelado de las características fenotípicas del AD

Una de las alteraciones más importantes que se producen en la enfermedad de Alzheimer es la pérdida sináptica desencadenada por la toxicidad del péptido β A. Esta pérdida sináptica es un fenotipo reproducido de manera pobre en modelos transgénicos (Chen *et al.*, 1998; Masliah y Rockenstein, 2000; Oddo *et al.*, 2003a), si bien la muerte neuronal masiva con distribución topográfica similar a la del AD ha sido recientemente reproducida en ratones APP^{SL}PS1KI, de manera independiente de la presencia de depósitos extracelulares de β A (Casas *et al.*, 2004). La relación entre los déficits cognitivos y la deposición de β A también ha sido controvertida en ratones transgénicos, debido a las inconsistencias entre el fenotipado cognitivo y el inicio de la neuropatología. Así, el declive cognitivo aparece mucho antes de la formación de placas de β A, y correlaciona con una reducida potenciación a largo plazo (*Long Term Potentiation*, LTP; ej. en ratones APP-C57BL/6, o ratones TgAPP/Ld/2 y TgAPP/Wt/4; Lee *et al.*, 2004; Moechars *et al.*, 1999) o no se relaciona con la deposición de β A sino con la atrofia del hipocampo (ej. en ratones TgPDAPP; Dodart *et al.*, 2000, 2002).

Asimismo, la expresión génica del transgen humano APP *wild-type* (APP normal), en ausencia de depósitos amiloides detectables, es suficiente para causar un declive de la memoria similar al producido por la expresión de genes de AD familiar mutados (Moechars *et al.*, 1999). Por otra parte, algunos autores sí que han indicado correlaciones entre el incremento en la deposición de placas β A relacionado con la edad y el agravamiento de algunos déficits de aprendizaje (ex. Chen *et al.*, 2000; Leighty *et al.*, 2004).

Por tanto, podemos concluir que en algunos de estos modelos transgénicos que sobreexpresan diferentes mutaciones de la APP o la APP humana *wild-type* en el cerebro, las alteraciones cognitivas (y tal vez otros BPSD) surgen antes de que

se inicie la neuropatología, y correlacionan de manera pobre con el número de placas, reafirmando la hipótesis de la “cascada amiloide” (Oddo *et al.*, 2003a). Como veremos a continuación, la presencia de alteraciones cognitivas y de sintomatología BPDS-like en ausencia de placas amiloides, y el desencadenamiento de la “cascada amiloide” propuesto en otros trabajos comentados anteriormente, se observa también en el modelo de ratón 3xTgAD utilizado en esta tesis.

2.3.2. El modelo 3xTgAD

El modelo de ratón triple transgénico 3xTgAD es portador de los transgenes humanos PS1_{M146V}, APP_{Swe} y tau_{P301L}. Este modelo fue creado a partir de la microinyección de los transgenes de la APP_{Swe} y tau_{P301L} en el pronúcleo de una célula embrionaria de un ratón *knock in* (o inducido) para el gen de la PS1_{M146V} (Oddo *et al.*, 2003a). El modelo desarrolla de manera progresiva las patologías β A y Tau en regiones cerebrales relevantes en el AD (como son la corteza, el hipocampo y la amígdala), con un perfil temporal y anatómico específico que parece reproducir el patrón que tiene lugar en el cerebro humano con Alzheimer (ver esquema inferior; Oddo *et al.*, 2005).

De manera consistente con la hipótesis de la cascada β A, la cual propone la acumulación de esta proteína como el desencadenante de todos los tipos de AD, la deposición de β A se inicia meses antes de la patología Tau, y los niveles de expresión de los transgenes APP y Tau son comparables (Oddo *et al.*, 2003b, 2005). A pesar que las patologías β A y Tau se inician en regiones cerebrales diferentes, se cree que los depósitos de β A podrían alterar el metabolismo celular dando lugar a cambios de conformación y de fosforilación de la Tau, y consecuentemente al inicio de la patología (Oddo *et al.*, 2003a-b).

Los depósitos de β A aparecen inicialmente en las regiones corticales, se inician en la corteza frontal (predominando en las capas 4 y 5), después se extienden hacia regiones corticales posteriores como la corteza occipital y parietal, y con la edad progresan hacia áreas límbicas como el hipocampo y la amígdala. Las regiones hipocámpicas del subículum y CA1 se ven particularmente afectadas, y en los ratones más envejecidos también se ha encontrado que la región CA3 y el giro dentado contienen extensos depósitos de β A. Mientras que la inmunoreactividad a la β A intraneuronal es detectable con el anticuerpo específico anti- β A42 a los 3 meses de edad, únicamente en la corteza cerebral, los depósitos extracelulares de β A no empiezan a aparecer de manera difusa hasta los 6 meses, edad en la que la β A intraneuronal ya está ampliamente extendida en la misma región. A esta edad, en el hipocampo ya se puede detectar la acumulación intraneuronal de β A, pero los depósitos no aparecen hasta edades más avanzadas (ver Tabla 2.2.). Un hallazgo interesante es el hecho de que la inmunoreactividad a la β A decrece entre los 9 y 12 meses de edad (Oddo *et al.*, 2006b). Por otra parte, los déficits sinápticos se manifiestan meses antes de que haya detección de agregados de β A, y correlacionan con la sobreexpresión de APP (más concretamente con la acumulación intraneuronal de β A), por tanto ya se encuentran a los 3 meses de edad (Oddo *et al.*, 2003b).

Por lo que respecta a la patología Tau, los agregados aparecen inicialmente en el hipocampo y con el envejecimiento del animal progresan hacia las regiones corticales. Para detectar los cambios en la conformación de la proteína, un requisito para la formación de los ovillos, se ha utilizado el anticuerpo MC1 (i el AT8, que reconoce la Tau fosforilada en la Serina 202 y Threonina 205), y se ha visto que los ovillos intraneuronales de Tau hiperfosforilada no aparecen hasta los 12 meses de edad en la región CA1 del hipocampo, y progresivamente se extienden hacia regiones corticales del ratón envejecido (ver Tabla 2.2.). Cabe tener en cuenta que es probable que las alteraciones de la Tau afecten también a la plasticidad sináptica en ratones envejecidos (Oddo *et al.*, 2003b; Medeiros *et al.*, 2010).

Ratones 3xTgAD						
	2 meses	3 meses	4 meses	6 meses	12 meses	15 meses
Corteza	∅	Inicio βA intraneuronal	βA intraneuronal	βA intraneuronal ampliamente extendida inicio de depósitos de βA extracelulares	depósitos de βA extracelulares extendidos	depósitos de βA extracelulares extendidos Ovillos de Tau
Hipocampo	∅	∅	βA intraneuronal	βA intraneuronal	depósitos de βA extracelulares extendidos Ovillos de Tau	depósitos de βA extracelulares extendidos Ovillos de Tau

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

El modelo 3xTgAD manifiesta disfunción sináptica, incluyendo déficits de LTP (Potenciación a Largo Plazo), de manera dependiente de la edad y previa a la formación de placas de βA y ovillos neurofibrilares (Oddo et al, 2003a; Morrissette et al., 2009; Querfurth y LaFerla, 2010), sugiriendo así un nuevo papel patológico de la βA intraneuronal. La inflamación cerebral también se desarrolla de manera relacionada con la edad y la microglia se co-localiza con las placas de βA (Kitazawa et al., 2005). Además, el modelo muestra una pérdida selectiva y “edad-dependiente” de receptores colinérgicos α7nAChRs en el hipocampo y la corteza, que aparece a los 6 meses de edad y correlaciona con el aumento intraneuronal de βA (Oddo et al., 2005). Todas estas alteraciones son coherentes con el hecho de que el fenotipo conductual del modelo 3xTgAD se ve alterado a edades tempranas, previas a la detección de placas, como se ha demostrado en varios estudios sobre el perfil cognitivo del modelo (Billings et al., 2005; García-Mesa et al., 2011; Giménez-Llort et al., 2007).

En línea con lo comentado anteriormente, Billings *et al.* (2005) comprobaron que el modelo 3xTgAD presenta déficits de memoria a los 4 meses de edad, de manera dependiente de la aparición de la β A intraneuronal, incrementándose éstos déficits a medida que se aumenta la acumulación de la patología β A. Estos resultados son consistentes con la evidencia de que los déficits de memoria preceden la patología β A extracelular también en otros modelos de ratón para el AD (Mucke *et al.*, 1994; Hsiao *et al.*, 1996; Moechars *et al.*, 1999; Dodart *et al.*, 2002; Van Dam *et al.*, 2003), e indican que las alteraciones funcionales que se dan de manera temprana, más que las modificaciones estructurales significativas, conllevan el inicio del declive cognitivo (Billings *et al.*, 2007).

En edades más avanzadas, cuando los depósitos extracelulares de β A empiezan a aparecer, Romberg *et al.* (2011) han demostrado que los ratones 3xTgAD también muestran alteraciones en la capacidad de atención, hecho que contribuiría al empeoramiento de la memoria y otras capacidades cognitivas de los animales.

2.4. FACTORES AMBIENTALES QUE INFLUENCIAN EL RIESGO DE SUFRIR AD

Los factores de riesgo son los antecedentes que influyen parte del patrón de desarrollo de la enfermedad, y pueden ser asociados con la etiología o la progresión de la enfermedad (Reitz *et al.*, 2011). Al igual que en otras enfermedades relacionadas con la edad (como son las enfermedades cardiovasculares, diabetes, cáncer, etc.), probablemente hay factores de comportamiento, dietéticos, así como ambientales, que pueden influenciar el riesgo de sufrir Alzheimer. Sin embargo, este área de investigación no está todavía suficientemente madura como para establecer recomendaciones

claras. Diversos resultados epidemiológicos sugieren que un bajo nivel educativo, historial de trauma cerebral, un elevado consumo de calorías, dietas ricas en grasas y un estilo de vida sedentario, así como los factores de riesgo de isquemia vascular, la diabetes, la hipertensión, fumar o la obesidad, podrían incrementar el riesgo de sufrir demencia y AD (Mayeux, 2003; Mattson, 2003; Pope *et al.*, 2003; Reitz *et al.*, 2011). Por otra parte, otros estudios han demostrado que cuando los roedores son mantenidos en un ambiente cognitivamente estimulante o en régimen de restricción de la dieta, las neuronas de su hipocampo son más resistentes a la muerte y la neurogénesis se ve incrementada (Mattson, 2003; Lee *et al.*, 2002).

Según algunos autores, el ejercicio físico, la estimulación cognitiva y la restricción calórica podrían ejercer cada uno, mediante mecanismos diferentes, un efecto beneficioso común que implicaría una mayor producción del factor neurotrófico BDNF (Mattson, 2003; Young, 1999; Lee *et al.*, 2002), a pesar de que la importancia del papel del BDNF en la enfermedad de Alzheimer está aún por determinar (Mattson, 2004).

La posibilidad de que el riesgo de padecer Alzheimer pueda ser reducido mediante modificaciones de la dieta y el estilo de vida es de gran interés, sugiriendo que la incidencia del AD podría reducirse mediante estrategias de prevención similares a las que reducen el riesgo de las enfermedades cardiovasculares (Mattson, 2004). A continuación comentaremos más detalladamente algunos de los factores ambientales más estudiados, y relacionados con el presente trabajo, que presumiblemente influyen sobre el riesgo de sufrir AD.

2.4.1. El ejercicio físico

El ejercicio físico tiene un efecto importante sobre el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer. Recientemente, los beneficios del ejercicio físico en pacientes con AD han empezado a tomar importancia, y estudios epidemiológicos han demostrado que la sencilla transición de una vida sedentaria a un estilo de vida activo podría ser suficiente para contener la muerte neuronal relativa a la edad, tanto en modelos animales como en pacientes con AD (Cotman y Berchtold, 2002; Fratiglioni *et al.*, 2004). Um *et al.* (2011) han demostrado que el ejercicio físico, en el modelo de ratón Tg-NSE/hPS2m para el AD, mejora el déficit de aprendizaje y memoria, reduce los niveles de deposición del péptido βA_{42} y de fosforilación de la Tau en el hipocampo, y restaura los niveles normales de colesterol global, glucosa, insulina y corticosterona, que se ven alterados en animales transgénicos no tratados con ejercicio. Otros autores también han demostrado que el ejercicio físico voluntario y/o regular incrementa los niveles de factores neurotróficos como el BDNF (*Brain-Derived Neurotrophic Factor*) y produce mejoras en algunas tareas cognitivas. Asimismo, de forma congruente mejora la plasticidad sináptica hipocámpica (la LTP), estimula la neurogénesis y muestra efectos neuroprotectores en el cerebro (Cotman y Berchtold, 2002; Liu *et al.*, 2011; Um *et al.*, 2011).

2.4.2. La dieta

La dieta es otro de los factores a tener en cuenta que podrían afectar al desarrollo de la enfermedad de Alzheimer. Existen estudios con resultados contradictorios en cuanto a los efectos beneficiosos de una dieta rica en antioxidantes y ácidos grasos poli-insaturados. Engelhart *et al.* (2002a), Masaki *et al.* (2000) y Morris *et al.* (2002 y 2009) mostraron como, en

poblaciones con un elevado consumo de alimentos ricos en vitaminas E y C (ambas antioxidantes), el riesgo de padecer declive cognitivo y AD era menor que en aquellas con bajo consumo de estas vitaminas. Asimismo, las dietas ricas en ácidos grasos poli-insaturados también se ha visto que reducen el riesgo de desarrollar demencia senil y AD (Huang *et al.*, 2005; Kalmijn *et al.*, 1997; Schaefer *et al.*, 2006), así como de MCI (*Mild Cognitive Impairment*; Roberts *et al.*, 2010) y de deterioro cognitivo relacionado con la edad (Solfrizzi *et al.*, 2006). Todo ello, parece además independiente del nivel de actividad física (Scarmeas *et al.*, 2009) o de la comorbilidad vascular (Scarmeas *et al.*, 2006). No obstante, otros estudios, sobre la influencia de las vitaminas (Laurin *et al.*, 2004; Luchsinger *et al.*, 2003) y los ácidos grasos poli-insaturados en el declive cognitivo relacionado con la edad, no han encontrado los mencionados efectos o asociaciones (Engelhart *et al.*, 2002b).

Por otra parte, las especies reactivas del oxígeno (*Reactive oxygen species*, ROS), o radicales libres, que son resultado del propio metabolismo celular, también están claramente asociadas con el daño neuronal en el AD. Cabe decir que el mecanismo por el cual actúan en la cascada amiloide, es decir, si son causa o consecuencia en el proceso neurotóxico, todavía no se ha descifrado (Reitz *et al.*, 2011). La acumulación de βA en el cerebro, conlleva una disminución de las concentraciones de hierro y cobre cerebral, resultando en un incremento del estrés oxidativo y del daño neuronal (Nagano *et al.*, 2004). En línea con lo anterior, estudios *in vitro* han demostrado que la vitamina E reduce la extensión de la peroxidación de lípidos inducida por el péptido βA , y por tanto de la muerte neuronal consecuencia de estas alteraciones (Butterfield *et al.*, 2002). Asimismo, los carotenos y la vitamina C también protegen de la peroxidación de los lípidos (Pitchumoni *et al.*, 1998). Otros estudios han demostrado como la ingesta de antioxidantes reduce el riesgo de AD mediante la reducción del riesgo de daño cerebrovascular (Vokó *et al.*, 2003). Y, por otro lado, a parte de la reducción de los niveles de estrés oxidativo, los ácidos grasos poli-insaturados tienen efectos beneficiosos sobre las funciones

neuronales y vasculares, además de actuar sobre los procesos inflamatorios, ayudando a disminuir el riesgo de sufrir demencia senil y AD (Calder *et al.*, 2001; Yehuda *et al.*, 2002).

Otro de los componentes de la dieta que influencia el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer es el colesterol. Se trata de un lípido con función estructural en las membranas celulares, que sirve como molécula de señalización intra y extra-celular, y puede modificar la función de muchos tipos de proteínas. Los individuos que consumen dietas ricas en colesterol (y aquellos con niveles elevados en sangre) podrían tener un mayor riesgo de sufrir AD, mientras que aquellos que toman fármacos para reducir los niveles de colesterol (las denominadas “Estatinas”), muestran una disminución del riesgo de sufrir AD (Puglielli *et al.*, 2003; Wolozin *et al.*, 2000). Se sabe que las dietas ricas en colesterol producen efectos adversos en el sistema vascular, hecho que podría contribuir al incremento del riesgo de sufrir AD. Sin embargo, hay estudios que indican que el colesterol podría alimentar directamente la cascada amiloide mediante la potenciación del procesamiento amiloidogénico de la APP. Los tratamientos con Estatinas disminuyen los niveles de βA y la formación de placas en los ratones transgénicos con APP (Fassbender *et al.*, 2001), los niveles elevados de colesterol y las alteraciones en el metabolismo de éste pueden incrementar la producción de βA en cultivos celulares y en los ratones transgénicos para la APP (Puglielli *et al.*, 2003). Las alteraciones en el metabolismo del colesterol podrían potenciar la degeneración neuronal mediante la perturbación de la fluidez de la membrana celular así como la transducción de señales (Mattson, 2004).

2.4.3. La actividad intelectual

A raíz de los resultados de estudios epidemiológicos iniciales, que postulaban que las personas de edad avanzada con mayores niveles de educación mostraban una menor incidencia de demencia que las personas de bajo nivel educativo, la actividad cognitiva fue propuesta como agente reductor del riesgo de sufrir deterioro cognitivo, mediante el aumento de la reserva cognitiva (p. ej. Petrosini *et al.*, 2009). Varios estudios prospectivos, concluyeron posteriormente que tanto las personas jóvenes (Carlson *et al.*, 2008) como las mayores (Fratiglioni *et al.*, 2007) que se involucran en actividades cognitivas estimulantes, como el aprendizaje, la lectura o los juegos, eran menos propensos a desarrollar demencia que las personas que no habían participado en estas actividades. Diversos estudios han demostrado un efecto beneficioso del entrenamiento intelectual sobre la función cognitiva en personas mayores sin demencia (p. ej. Acevedo *et al.*, 2007). Sin embargo, los beneficios del entrenamiento cognitivo parecen ser de dominio específico. Diversos estudios mostraron que a pesar de que el entrenamiento cognitivo puede mejorar la memoria, el razonamiento y la velocidad de procesamiento mental en las personas mayores (Acevedo *et al.*, 2007), dicha intervención no tiene efecto en todos los dominios cognitivos, de modo que no afecta al funcionamiento global cotidiano (Ball *et al.*, 2002). Además, también se observó que entre las personas de edad avanzada, aquellas con trastornos de memoria mostraban menos mejoría en la cognición a través del entrenamiento de la memoria, que aquellas que no mostraban déficits mnésicos iniciales (Unverzagt *et al.*, 2007). Por tanto, en las personas mayores, el efecto del entrenamiento cognitivo sobre el riesgo de sufrir demencia no está del todo claro, de ahí que se esté haciendo un esfuerzo en los estudios en curso para descifrar cuál es, concretamente, la influencia de la estimulación cognitiva en el cerebro de pacientes con demencia o con “sospecha” de la misma (Helzner *et al.*, 2007; Kaczmarek *et al.*, 2008; Nelson y O’Connor, 2008; Savica y Petersen, 2011).

En relación con lo anterior, desde los años 90 hasta la actualidad, se ha evaluado la capacidad de los tratamientos de enriquecimiento ambiental (EA) o/y de la actividad física, para generar procesos de neuroplasticidad o efectos antagonistas de la degeneración neuronal, tanto en roedores normales como en animales manipulados genéticamente que presenten algunos aspectos de la neuropatología típica del AD (Herring *et al.*, 2011; Hu *et al.*, 2010; Lazarov *et al.*, 2010; Redolat y Mesa-Gresa, 2011). Puesto que el tratamiento de enriquecimiento ambiental es crucial en el presente trabajo, en los apartados siguientes se definirán sus características principales y sus efectos más comunes, así como los hipotéticos mecanismos neurales que subyacen a sus efectos.

2.5. ¿QUÉ ES EL ENRIQUECIMIENTO AMBIENTAL?

El término enriquecimiento ambiental (EA), en roedores, se refiere a unas condiciones optimizadas de estabulación, por lo general en jaulas de tamaño mayor de lo común y que contienen objetos y espacios diversos, que facilitan el incremento de la estimulación sensorial, cognitiva y motora con respecto a las condiciones estándar de estabulación. En algunos paradigmas experimentales, el enriquecimiento ambiental puede también incluir el incremento de la estimulación social mediante el aumento del número de animales por jaula (Nithianantharajah y Hannan, 2006). De este modo, por un lado el EA comprende estrategias de enriquecimiento físico, que incluyen modificaciones estructurales como son el aumento del espacio de estabulación, el ejercicio, el juego, la exploración, y permite a los animales un cierto control sobre su ambiente. Y por otro lado, el EA también se compone de la estimulación social, siendo la estabulación de animales en grupo una fuente constante de interacciones dinámicas e impredecibles (Stewart y Bayne, 2004). Para observar mejor los efectos del EA, la combinación de ambos tipos de

estimulación, física y social, suele asumirse como la ideal (p. ej. Johansson y Olhsson, 1996).

La naturaleza exacta de los protocolos de EA utilizados varía ampliamente entre laboratorios y, a menudo, no han sido completamente descritos en los métodos experimentales publicados. Los objetos utilizados para el enriquecimiento generalmente varían en cuanto a composición, forma, tamaño, textura, olor y color. El tiempo diario que los animales transcurren en las cajas de enriquecimiento, si éste se complementa con la exposición a otros ambientes o tareas (y, en cuántas tareas/situaciones diferentes y/o con qué frecuencia), son también factores que varían entre procedimientos/estudios que pueden implicar influencias notables sobre los resultados (Nithianantharajah y Hannan, 2006). Además, existen diferencias relativas a si el enriquecimiento implica tener (o no) acceso a “ruedas para correr”, lo cual tiene implicaciones significativas ya que el aumento del ejercicio voluntario por sí sólo produce efectos en el cerebro (Cotman y Berchtold, 2002; Liu *et al.*, 2011; Um *et al.*, 2011).

Todavía no existe un consenso sobre qué paradigmas del EA son ideales por lo que respecta a los efectos beneficiosos en el cerebro y la conducta. De modo que, diversos estudios que han examinado los efectos del EA en varias enfermedades mentales modeladas en roedores de laboratorio, han utilizado una gran variedad de condiciones metodológicas. Un aspecto clave parece ser la provisión de la complejidad ambiental, con objetos de enriquecimiento que proporcionen una amplia gama de oportunidades para la estimulación visual, somato-sensorial y olfativa. Otro de los aspectos clave parece ser la novedad ambiental, lograda a través del cambio de los objetos así como de la posición de éstos en la caja de EA, que podría proporcionar estimulación cognitiva adicional con respecto a la formación de mapas espaciales. Se asume que el incremento de la complejidad, así como la novedad, proporcionaría mayores niveles de estimulación, de igual modo que el incremento de la actividad física.

Sin embargo, esto también depende de si diferentes modelos animales (p. ej. animales con características genéticas especiales y diferentes), interactúan de diverso modo con los ambientes enriquecidos. Finalmente, otro de los parámetros clave que varía ampliamente dentro de la literatura es la edad a la que se inicia el EA, así como la duración de la exposición a éste. Si el tratamiento de EA se inicia antes de la edad adulta (habitualmente considerada a partir de las 8-10 semanas de edad en roedores), entonces podría tener efectos adicionales en el desarrollo del cerebro, comparado con aquellos obtenidos si el enriquecimiento ambiental se inicia en la adultez (Nithianantharajah y Hannan, 2006).

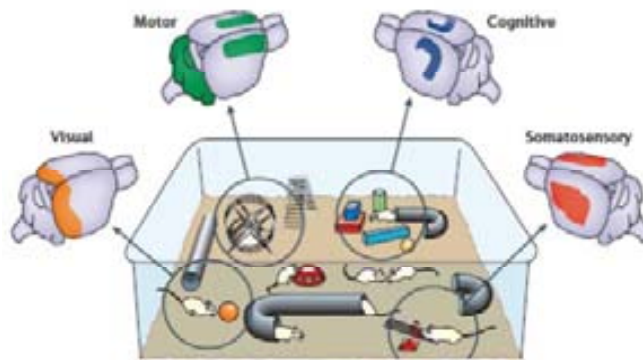


Figura 2.4.- Efectos del *enriquecimiento ambiental de incremento de la estimulación sensorial, cognitiva y motora, sobre las diferentes áreas cerebrales. El EA puede promover la activación neuronal, la transmisión de señales neuronales y la plasticidad en varias regiones cerebrales. La estimulación sensorial, incluyendo el aporte (input) somato-sensorial y visual, activa la corteza somato-sensorial (rojo) y visual (naranja). La estimulación cognitiva – por ejemplo, la información codificada relacionada con los mapas espaciales, el reconocimiento de objetos, la novedad y la modulación de la atención – es posible que active el hipocampo (azul) y otras áreas corticales. Además, la actividad motora, así como la actividad exploratoria (incluyendo patrones motores que difieren radicalmente de la actividad aislada en la “rueda de correr”), estimulan áreas como la corteza motora y el cerebelo (verde).*

2.5.1. Historia y efectos principales del EA en roedores

Desde antes del nacimiento, un organismo ya está sometido a las influencias del medio. Diversos estudios indican que el feto humano desarrolla respuestas conductuales a partir del cuarto mes de gestación, respondiendo a sonidos, presentando respuestas hormonales al estrés y, a medida que avanza la gestación, aumentando la variabilidad del ritmo cardíaco en respuesta a la estimulación (p. ej. Austin *et al.*, 2005). Este tipo de estudios son ejemplos de la importancia que pueden tener los factores ambientales en la determinación de la conducta, e indican que el producto final será fruto de las interacciones que se produzcan entre la carga genética y las características del ambiente en el que se desarrolle el organismo. Más concretamente, y en relación al estudio de la interacción ambiente-organismo, los efectos del tratamiento de EA han puesto en evidencia el importante papel que juega la experiencia en el desarrollo definitivo del sistema nervioso y su reflejo en la conducta.

Tal y como indica Rosenzweig (1979), las primeras investigaciones sobre el enriquecimiento ambiental fueron realizadas por M.V. Malacarne (1744-1816), autor de la investigación sobre la influencia del tratamiento de EA en el sistema nervioso central. Malacarne encontró que, pájaros que habían recibido un tratamiento de EA, mostraban cerebros de mayor tamaño (este hecho era especialmente evidente en el cerebelo) que sus equivalentes no enriquecidos, que habían sido mantenidos en condiciones de aislamiento y que provenían de la misma nidada de huevos (ver Renner y Rosenzweig, 1987). Sin embargo, la investigación experimental sistemática sobre la influencia de la cría en ambientes enriquecidos (jaulas grandes, con diversos tipos de objetos y configuraciones espaciales, que son reemplazados de manera frecuente; ver Figura 2.4.) sobre el comportamiento (y posteriormente sobre el desarrollo del cerebro), se considera que fue iniciada en 1947, cuando D.O. Hebb informó que los animales criados en un ambiente enriquecido mostraban una mayor

capacidad de aprendizaje que sus homólogos no enriquecidos (ver Hebb, 1949, citado en Morris, 1999; Forgays y Forgays, 1952).

Desde entonces se ha acumulado una gran cantidad de literatura sobre los efectos del EA sobre el comportamiento espontáneo, el aprendizaje y los procesos neurobiológicos (p. ej. Arai y Feig, 2011; Fernández-Teruel *et al.* 1997, 2002; Lazarov *et al.*, 2010; Mohammed *et al.* 1993, 2002; Redolat y Mesa-Gresa, 2011; Renner y Rosenzweig, 1987; Simpson y Kelly, 2011; Van Praag *et al.*, 2000). De modo que, actualmente, se tienen evidencias de que algunos de los efectos del enriquecimiento ambiental en el cerebro de roedores comprenden el aumento de la neurogénesis, el incremento de la dendrificación neuronal, el incremento del tamaño celular y las mejoras de aprendizaje y memoria (ej. Fernández-Teruel *et al.*, 2002; Nithianantharajah y Hannan, 2006; Mohammed *et al.*, 2002; Petrosini *et al.*, 2009). Estas respuestas de plasticidad neuronal, inducidas por el EA, tendrán a su vez un importante papel en la recuperación de las enfermedades neurodegenerativas, el daño cerebral y los desórdenes psiquiátricos, al menos tal y como son estudiados en modelos animales (Will *et al.*, 2004; van Praag *et al.*, 2000; Nithianantharajah y Hannan, 2006; Laviola *et al.*, 2008; Solinas *et al.*, 2010).

2.5.2. Efectos del EA en roedores *wild-type*

Ya lo anunciaron S.R. Cajal y, posteriormente D.O. Hebb: El cerebro es una estructura que posee la propiedad de la plasticidad, lo cual significa que puede cambiar en función de las señales del entorno, y que tiene una enorme capacidad de adaptación. Los factores ambientales influyen en la función y estructura cerebral, de forma que la experiencia tiene consecuencias más o menos perdurables a diferentes niveles de integración.

2.5.2.1. Cambios morfológicos

Los primeros cambios biológicos causados por el EA, observados en ratas, fueron un incremento de peso y volumen cortical de hasta un 5% (Bennett *et al.*, 1969; Rosenzweig *et al.*, 1962) en la corteza visual, somato-sensorial y frontal posterior. Posteriormente, se observó que el EA incrementaba el grosor de la corteza occipital (Diamond *et al.*, 1964), el volumen del hipocampo (Diamond *et al.*, 1976; Walsh *et al.*, 1969) (Rosenzweig *et al.*, 1972), aumentaba el área cortical total (Juraska y Meyer *et al.*, 1986) e incluso el volumen de algunas áreas subcorticales (Greenough *et al.*, 1973).

Asimismo, los efectos que han despertado un mayor interés durante los últimos años, son los referentes a la capacidad del EA para incrementar la neurogénesis. Se ha visto que el enriquecimiento produce un aumento en el número de neuronas granulares en el giro dentado del hipocampo del ratón (Kempermann *et al.*, 1997) y de rata adulta y vieja (Segovia *et al.*, 2006; ver p. ej. revisión de van Praag *et al.*, 2000). Con ello se demuestra que el enriquecimiento ambiental produce cambios en el cerebro independientemente de la edad del organismo, siendo posible la plasticidad cerebral a lo largo de toda la vida.

Por otro lado, el enriquecimiento ambiental no sólo induce cambios en la densidad neuronal, sino que ya era conocido que la propia arquitectura celular se ve modulada por el tratamiento. Así, se ha observado que el EA produce una expansión del citoplasma celular (Beaulieu y Colonnier, 1989; Greenough *et al.*, 1973), un alargamiento de las dendritas de las neuronas (Floeter y Greenough, 1979) y además un incremento en la complejidad del árbol dendrítico, que viene dado por un incremento en la ramificación dendrítica (Pascual y Figueroa, 1996; Volkmar y Greenough, 1972), en el número de espinas dendríticas (Rampon *et al.*, 2000b) y en la densidad de las espinas (Berman *et*

al., 1996; Comery *et al.*, 1995). Como las espinas dendríticas son lugares donde se establecen las conexiones sinápticas, este incremento en densidad es una indicación indirecta de un incremento en la actividad sináptica de las neuronas piramidales, de modo que este aumento en el número de puntos de intercambio de información podría tener consecuencias funcionales sobre la capacidad de procesamiento de información.

Resumiendo, el enriquecimiento ambiental produce múltiples efectos que van desde el nivel molecular al conductual. Varios estudios han demostrado que el EA incrementa la ramificación y longitud dendrítica, el número de espinas dendríticas y el tamaño y plasticidad de las sinapsis en algunas poblaciones neuronales (Artola *et al.*, 2006; Duffy *et al.*, 2001; Greenough *et al.*, 1973; Hargreaves *et al.*, 1992; Sharp *et al.*, 1985). Además, el EA incrementa la neurogénesis en el hipocampo, y la integración de estas nuevas células en los circuitos funcionales (Bruel-Jungerman *et al.*, 2005; Kempermann *et al.*, 1997, 1998a-b; Van Praag *et al.*, 2000).

2.5.2.2. Cambios celulares y neuroquímicos

Todas estas modificaciones neuromorfológicas, encuentran una explicación mejor si se tienen en cuenta los resultados que muestran la influencia del EA sobre la expresión génica y la producción de factores neurotróficos. Se ha visto que el enriquecimiento ambiental incrementa la expresión de un gran número de genes, muchos de los cuales están relacionados con la estructura, la plasticidad y la transmisión neuronal (Rampon *et al.*, 2000a).

Se ha encontrado que el enriquecimiento ambiental induce un aumento en la expresión de genes que codifican proteínas relacionadas con la síntesis y el procesamiento de macromoléculas, incluyendo factores de transcripción, y

enzimas relacionadas con el DNA, el RNA y el procesamiento de proteínas. También se han descrito efectos sobre la expresión de genes que codifican proteínas proteolíticas encargadas de la señalización y la apoptosis. Por ejemplo, la Prolyl oligopeptidasa, la caspasa-6 y la proteasa-4, mostraron una disminución tras 3 y 6 horas de exposición en ratones a un ambiente enriquecido. La Prolyl oligopeptidasa regula la degradación de neuropéptidos como la vasopresina y la sustancia P, que juegan un importante papel en la señalización neuronal. Además, inhibidores de la Prolyl oligopeptidasa mejoran el aprendizaje y se estudian para el tratamiento del AD (Shinoda *et al.*, 1999).

Los ratones enriquecidos también muestran cambios en la expresión de genes relacionados con la formación de nuevas sinapsis y la reorganización y fortalecimiento de las sinapsis existentes. Por ejemplo, la exposición a un ambiente enriquecido aumenta hasta 3 veces la expresión del gen que codifica la Integrina α -4, proteína de gran importancia para la plasticidad neural (Rampon *et al.*, 2000a).

Otros estudios han demostrado que el EA también alteró muchos genes asociados con cambios estructurales que ocurren durante el crecimiento neuronal. Por ejemplo, se encontró un incremento de la expresión de la proteína citoesquelética Dinactina, implicada en el crecimiento neuronal y la sinaptogénesis, y la Cortactina, que participa en la formación de sinapsis y plasticidad, mediante interacciones con receptores NMDA y con el complejo proteínico PSD-95 (proteína post-sináptica de densidad-95) (Martin *et al.*, 1999; Naisbitt *et al.*, 1999). El enriquecimiento, a su vez, también incrementa la expresión de las proteínas sinápticas Synaptophysina (proteína de las vesículas presinápticas) y la PSD-95 (Frick *et al.*, 2003; Lambert *et al.*, 2005; Nithianantharajah *et al.*, 2004), que, como consecuencia, también participarán en el incremento de la sinaptogénesis.

Otro tipo de moléculas que incrementan su nivel de expresión como consecuencia del enriquecimiento ambiental son los factores neurotróficos. Estas moléculas ejercen funciones de plasticidad neuronal, neurogénesis y mejoras del aprendizaje. Se trata de proteínas especiales de señalización endógena que promueven la supervivencia, la división y el crecimiento, así como la diferenciación y plasticidad morfológica de las células cerebrales. Los factores neurotróficos nutren las neuronas durante el desarrollo, la etapa adulta y la vejez. Existen diferentes factores neurotróficos, como por ejemplo el NGF (*Nerve Growth Factor*), o el BDNF (*Brain Derived Neurotrophic Factor*), NT-3 (Neurotrofina-3) y la NT-4/5 (Neurotrofina-4/5) (Pham *et al.*, 2002). Diversos estudios han demostrado que al menos 3 miembros de la familia de los factores neurotróficos, el NGF, el BDNF y la NT-3, se expresan abundantemente en el hipocampo y están involucrados en la neuroplasticidad asociada al aprendizaje y la memoria (Ernfors *et al.*, 1988). En el cerebro de la rata, los mayores niveles de NGF se encuentran en las áreas diana de las neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal, incluyendo el hipocampo, la corteza cerebral y el bulbo olfatorio. Tras el enriquecimiento ambiental se ha descrito un incremento de los niveles de mRNA del factor de crecimiento neuronal (NGF) en corteza visual e hipocampo (Torasdotter *et al.*, 1998), y se han encontrado niveles elevados de BDNF, NGF y NT-3 en el prosencéfalo basal medial y la corteza cerebral de ratas enriquecidas (Ickes *et al.*, 2000).

A su vez, muchos de estos cambios celulares también son consistentes con las alteraciones inducidas por el EA en la expresión de genes involucrados en la función sináptica y la plasticidad sináptica (Rampon *et al.*, 2000a). Como ya hemos comentado, el EA aumenta los niveles de neurotrofinas, como el factor neurotrófico BDNF y el factor de crecimiento nervioso NGF, los cuales juegan un papel integral en la transmisión del impulso nervioso (Ickes *et al.*, 2000; Pham *et al.*, 1999; Torasdotter *et al.*, 1998). Además, el enriquecimiento induce alteraciones en la expresión de los receptores NMDA (*N*-methyl-D-aspartate) y AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid), que forman

parte de la transmisión de señales glutamatérgicas (Naka *et al.*, 2005; Tang *et al.*, 2001). En este sentido, en el estudio de Segovia *et al.* (2006) se halló un incremento en los niveles de Glutamato y GABA en la región CA3 del hipocampo en ratas viejas.

Este hecho proporciona consistencia a la evidencia de que el EA puede alterar los niveles de expresión de un gran número de genes relacionados con la estructura neuronal, la transmisión sináptica y la plasticidad, mecanismos relacionados, a su vez, con el aprendizaje y la memoria, incluyendo formas específicas de plasticidad sináptica como es el caso de la potenciación a largo término (LTP) (Artola *et al.*, 2006; Duffy *et al.*, 2001; Foster *et al.*, 1996, 2001; Green y Greenough, 1986).

2.5.2.3. Cambios conductuales

Aprendizaje y memoria

Los cambios morfológicos y de expresión génica descritos anteriormente son importantes por ellos mismos como indicadores de la plasticidad cerebral, pero adquieren una importancia mayor si se consideran sus implicaciones en el aprendizaje y la memoria. De hecho, uno de los efectos del EA que ha despertado mayor interés por su posible proyección terapéutica y preventiva es el impacto de este tratamiento sobre los procesos cognitivos.

Los primeros trabajos de enriquecimiento ambiental fueron dirigidos a resolver cuestiones tales como cuánto tiempo de EA era necesario para incrementar las capacidades cognitivas de los sujetos, o en qué momento de la vida se debía aplicar la experiencia del EA para que pudiese reflejarse en la conducta (Diamond, 1988; Forgyas y Read, 1962). Se analizaron los efectos del

EA administrado en ratas de diferentes edades (de 0 a 21 días, de 22 a 43 días, de 44 a 65 días, de 66 a 87 días, y de 88 a 109 días) y 2 semanas después de la finalización del EA evaluaron las habilidades cognitivas de estos animales en el laberinto Hebb-Williams. El tratamiento de EA mejoró la habilidad de las ratas en el laberinto a cualquier edad, aunque las diferencias más marcadas se produjeron en el grupo que había recibido el enriquecimiento del día 22 al 43. Estos resultados, obtenidos en aquella tarea de aprendizaje, mostraron consistencia con los datos provenientes de los estudios anatómicos y morfológicos, que indicaban que la corteza cerebral podía ser alterada a cualquier edad a consecuencia del EA, pero había unas edades en las que los efectos observados eran más marcados que en otras (Diamond, 1988). Por otro lado, Renner y Rosenzweig (1987) observaron que cuanto más compleja era la tarea de aprendizaje, mayores diferencias se producían entre animales enriquecidos y aislados. En comparación con los animales control, las ratas enriquecidas también presentaron mayor habituación de la actividad exploratoria en situaciones de novedad (Del Arco *et al.*, 2007; Duffy *et al.*, 2001; Schrijver *et al.*, 2002; Zimmermann *et al.*, 2001), mayor condicionamiento contextual y mayor capacidad para discriminar entre diferentes ambientes (Barbelivien *et al.*, 2006; Duffy *et al.*, 2001). El EA también mejoró la memoria evaluada mediante la tarea de reconocimiento de objetos (Bruel-Jungerman *et al.*, 2005; Escorihuela *et al.*, 1995c; Gobbo y O'Mara, 2004;), mejoró la adquisición y la retención de la prueba de evitación activa en dos sentidos (Escorihuela *et al.*, 1994a) y redujo los déficits de aprendizaje/memoria espacial a corto y a largo plazo observadas en ratas viejas (Escorihuela *et al.* 1995a; Fernández-Teruel *et al.*, 1997; Soffié *et al.*, 1999), así como los déficits de aprendizaje/memoria observados en ratones viejos (Bennett *et al.*, 2006; Diniz *et al.*, 2010).

En general, el EA es eficaz aumentando el rendimiento en tareas de aprendizaje/memoria (Lee *et al.*, 2003; Mohammed *et al.*, 1990; Pacteau *et al.*, 1989; Park *et al.*, 1992; Rampon *et al.*, 2000b; Schrijver *et al.*, 2002; Tang *et al.*,

2001), como por ejemplo el Laberinto acuático de Morris (Escorihuela *et al.*, 1995a; Falkenberg *et al.*, 1992), y la ejecución de los animales en tareas hipocampo-dependientes, como son el reconocimiento de objetos, el aprendizaje espacial, el de la evitación activa en dos sentidos y el condicionamiento contextual comentados anteriormente, sugiriendo que sus efectos podrían estar relacionados con la modulación de la actividad del hipocampo y estructuras subcorticales asociadas. De hecho, en apoyo de esto, ya hemos comentado en la sección anterior fenómenos de plasticidad neuronal en el hipocampo tras la exposición al tratamiento de EA (Artola *et al.*, 2006; Duffy *et al.*, 2001; Foster *et al.*, 1996, 2001; Green y Greenough, 1986).

La mejora del aprendizaje y la memoria inducida por el EA, podría estar relacionada con los efectos celulares sobre la plasticidad sináptica y la neurogénesis hipocampal, si bien estudios recientes sugieren que el aumento de la proliferación celular en el hipocampo no es imprescindible para la mejora de función de la memoria espacial (Meshi *et al.*, 2006).

Actividad espontánea, exploración y temerosidad

La exposición al enriquecimiento ambiental modifica otros parámetros generales de conducta de los sujetos, además de los cambios descritos anteriormente en tareas cognitivas. En cuanto a los efectos de EA sobre la temerosidad de los animales, se ha visto que dicho tratamiento disminuye la ansiedad en roedores (Benaroya-Milshtein *et al.*, 2004; Chapillon *et al.*, 1999; Friske *et al.*, 2005; Roy *et al.*, 2001). En medidas de actividad espontánea y exploración en situaciones de novedad, en general se ha observado un incremento de la actividad exploratoria, por ejemplo en el test de Campo abierto (Denenberg *et al.*, 1968; Ferchmin y Eterovic, 1970; Larsson *et al.*, 2002; Ray y Hochhauser, 1969; Widman y Rosellini, 1990). Sin embargo,

existen también ejemplos de resultados contradictorios respecto a este tipo de situaciones/tests de novedad (e incluso de ansiedad), pues otro estudio realizado con ratones mostró resultados opuestos y el EA disminuyó la actividad exploratoria, contabilizada por el número de levantamientos (*rearings*) y la locomoción en el Campo abierto (Pietropaolo *et al.*, 2004). Y en otro trabajo, las ratas enriquecidas disminuyeron la actividad locomotora en un ambiente inescapable en comparación con las aisladas (Bowling *et al.*, 1993; Smith *et al.*, 1997), mientras que entraron en un compartimento nuevo y manipularon objetos nuevos más rápidamente que los animales aislados (Renner y Rosenzweig, 1987).

Aún en esa línea de resultados incongruentes, otros estudios han mostrado que el EA aumenta la conducta exploratoria en el test de la Tabla de agujeros (Escorihuela *et al.*, 1994a-b; Fernández-Teruel *et al.*, 2002; Peña *et al.*, 2009), aunque también hay estudios que no han hallado diferencias entre los grupos en los niveles de exploración (Freeman y Ray, 1972; Rose *et al.*, 1985). Los factores que podrían explicar estas inconsistencias pueden tener que ver con la variedad de pruebas de conducta a la que se someten los animales, de manera que algunas situaciones experimentales podrían no estar reflejando propiamente “conducta exploratoria” o “curiosidad/búsqueda de novedad”, sino tal vez fenómenos como la “habitación” (Fernández-Teruel *et al.*, 2002b; Zimmermann *et al.*, 2001). Otros aspectos que pueden tener que ver con la diversidad de resultados serían la presencia o ausencia de “objetos nuevos/desconocidos” en cada prueba en particular, además del hecho de que en algunos estudios (pero no en todos) se compararon animales estabulados en grupos en un ambiente enriquecido con animales estabulados individualmente, en condiciones empobrecidas (ver revisiones y discusiones en Fernández-Teruel *et al.*, 2002b; Mohammed *et al.*, 1993; Renner y Rosenzweig, 1987; Zimmermann *et al.*, 2001).

No obstante la anterior controversia, el hecho de que el EA produzca una reducción en las defecaciones en el Campo abierto (Fernández-Teruel *et al.*, 1997; Larsson *et al.*, 2002), reduzca la hiponeofagia (Meshi *et al.*, 2006) y mejore muy significativamente la adquisición de la evitación activa en dos sentidos (tarea que es sabido que depende de los niveles de ansiedad condicionada –a menor ansiedad mejor adquisición-; Escorihuela *et al.*, 1994a; Fernández-Teruel *et al.*, 1991), supone evidencia en general consistente a favor de la idea de que el EA induce disminuciones en los niveles de temerosidad o ansiedad (dependiendo de la situación que se trate). En apoyo de lo anterior, el enriquecimiento ambiental aumentó el número de entradas y la distancia recorrida en los brazos abiertos (del laberinto en cruz elevado) en ratas de ambos sexos (Peña *et al.*, 2009). Asimismo, otro estudio observó un efecto similar en ratones tres meses después de la finalización del tratamiento de EA. Incluso la descendencia de estos ratones, evaluada a los tres meses de edad, también mostró una disminución de la emotividad en el Laberinto elevado en cruz, sugiriendo efectos epigenéticos del EA (Friske y Gammie, 2005).

Por último, y reforzando la idea de que los animales (ratas o ratones) que reciben enriquecimiento ambiental son menos sensibles a situaciones de ansiedad o estrés, Roy *et al.* (2001) demostraron que los ratones enriquecidos presentaban menor respuesta de la corticosterona al estrés/ansiedad de ser expuestos a “olor de gato”. En la misma línea van los resultados de Peña *et al.* (2009), que mostraron una reducción global de la corticosterona en respuesta al estrés (exposición a la novedad) en ratas macho y hembra que recibieron EA.

Debido a que uno de los componentes del EA puede involucrar la estimulación motora, diversos estudios han investigado de manera aislada los efectos de la actividad motora (o, ejercicio físico) en el cerebro, mediante el acceso de los ratones a las “ruedas de correr” o carrera forzada. Dichos estudios han demostrado que el incremento de la actividad motora aumenta los niveles de

BDNF (Albeck *et al.*, 2006; Bick-Sander *et al.*, 2006; Black *et al.*, 1990; Ehninger *et al.*, 2003; Isaacs *et al.*, 1992; Neeper *et al.*, 1995; Swain *et al.*, 2003; Tong *et al.*, 2001; van Praag *et al.*, 1999), promueve la angiogénesis en la corteza y el cerebelo de roedores (Black *et al.*, 1990; Isaacs *et al.*, 1992; Swain *et al.*, 2003), incrementa la proliferación y supervivencia celular en el hipocampo, así como la proliferación de la microglía en el córtex (Ehninger *et al.*, 2003). Recientemente se ha observado, en ratas, que el ejercicio realizado durante el embarazo (en la “rueda de correr”) produce incluso incrementos de la neurogénesis de la descendencia (Bick-Sander *et al.*, 2006). En otro estudio se demostró que el ejercicio forzado también mejora el aprendizaje (Albeck *et al.*, 2006).

A pesar de que la actividad física por sí sola puede resultar en diversos efectos beneficiosos observados en el EA, no explicaría completamente todos los cambios cognitivo-conductuales y celulares observados después del tratamiento (ej. Wolf *et al.*, 2006).

2.5.3. Efectos del EA en roedores transgénicos con AD

Levi *et al.* (2003) fueron de los primeros en examinar los efectos del EA en un modelo de ratón de AD, utilizando ratones transgénicos que contenían los alelos humanos ApoE ϵ 3 o bien ApoE ϵ 4. Los ratones transgénicos para la ApoE ϵ 3 humana que fueron estabulados en un ambiente enriquecido mostraron una mejoría de las funciones cognitivas. Sin embargo, los ratones transgénicos para la ApoE ϵ 4 (proteína que está asociada a un mayor riesgo de sufrir AD) no mostraron esta mejora en respuesta al EA. Además, los efectos de la mejora cognitiva fueron asociados a niveles elevados de Synaptophysin y NGF en el hipocampo solamente en los ratones transgénicos ApoE ϵ 3, y no en los ApoE ϵ 4, a pesar de mostrarse un aumento similar de los niveles de dichas proteínas en la corteza de las dos cepas de ratones en respuesta al EA. Más

adelante, Levi y Michealson (2007) observaron que el EA inducía neurogénesis en los ratones ApoEε3 y apoptosis neuronal en los ApoEε4.

Desde entonces, el diseño de nuevos modelos de ratones transgénicos y la aplicación de diversos protocolos de enriquecimiento ambiental, han hecho posible avanzar en la investigación de los efectos beneficiosos de la estimulación cognitiva, física y social que produce el EA, en el desarrollo del AD. Así, la investigación reciente ha sido dirigida hacia el estudio de los efectos del EA sobre la neuropatología y la función cognitiva en modelos transgénicos de AD. Como ya hemos comentado anteriormente, la pérdida sináptica correlaciona significativamente con el declive cognitivo en el AD (Coleman *et al.*, 2003; DeKosky *et al.*, 1990, 1996), y las propiedades plásticas de las sinapsis hacen de ellas unos candidatos ideales para su modulación mediante la estimulación ambiental, la cual podría llevar al retraso o la inversión del declive cognitivo. De hecho, la evidencia epidemiológica sugiere que la estimulación cognitiva y la actividad física pueden prevenir o retrasar el inicio del AD (Friedland *et al.*, 2001; Laurin *et al.*, 2001; Stern *et al.*, 1994; Valenzuela *et al.*, 2006).

2.5.3.1. Efectos sobre la conducta: cognición y temerosidad

En diversos modelos transgénicos para la enfermedad de Alzheimer, donde la pérdida sináptica es una de las características principales asociadas al declive cognitivo (Coleman *et al.*, 2003; DeKosky *et al.*, 1996), se ha observado que el enriquecimiento ambiental muestra un efecto beneficioso sobre la plasticidad sináptica, atenuando dicho declive cognitivo (Nithianantharajah y Hannan, 2006). En línea con lo comentado, se ha sugerido que la mejora cognitiva que resulta de la administración del tratamiento de EA se debe a la generación de una reserva cognitiva, que se origina especialmente en determinadas

estructuras cerebrales afectadas en el AD, como la corteza y el hipocampo (ver revisión de Redolat y Mesa-Gresa, 2011). De este modo, los ratones transgénicos enriquecidos tendrían de mayores recursos cognitivos que sus homólogos sin tratamiento de EA.

En general, en la mayoría de trabajos en los que se ha administrado un tratamiento de EA en distintos modelos de ratones transgénicos para el AD, independientemente de la duración del tratamiento y de la fase de desarrollo de la neuropatología en la que se encuentran los animales, el enriquecimiento ambiental ejerce efectos de mejora del deterioro cognitivo que muestran los animales.

Así, encontramos que en los trabajos de Arendash *et al.* (2004) en el modelo de ratón APP_{sw}, y Costa *et al.* (2007) en el modelo PS1/PDAPP, el tratamiento de EA recupera los déficits de aprendizaje/memoria de referencia, los déficits de memoria espacial a largo plazo, incrementa la flexibilidad de aprendizaje, y mejora la memoria de trabajo. Berardi *et al.* (2007), en el modelo de ratón AD11, y Wolf *et al.* (2006) con el modelo APP23, muestran como el EA también mejora el déficit de aprendizaje/memoria de referencia, el de memoria a largo plazo en ambos modelos transgénicos, y el déficit de memoria espacial a corto plazo en el modelo AD11. Asimismo, Cracchiolo *et al.* (2007), en el modelo APP_{sw}+PS1, observan una mejora del déficit de aprendizaje y memoria de referencia, de la memoria de trabajo, así como la recuperación de la flexibilidad de aprendizaje. Y, entre los precursores de la utilización del EA en modelos transgénicos de AD, Jankowsky *et al.*, (2005) observan que el EA mejora los déficits aprendizaje y memoria de referencia, la flexibilidad del aprendizaje y de la memoria de trabajo en los modelos APP_{swe}/PS1ΔE9, APP_{swe}, y en el PS1ΔE9, además de la memoria a largo plazo en los modelos APP_{swe}, y en el PS1ΔE9.

Sin embargo, aunque son minoritarios, también encontramos algunos trabajos en los que el EA no ejerce mejoras cognitivas sobre los déficits que presentan los ratones transgénicos. Este es el caso del trabajo de Görtz *et al.* (2008), en el que el EA no recupera los déficits cognitivos de aprendizaje y memoria espacial, ni de memoria a corto plazo en el modelo TgCRND8. Cotel *et al.* (2010), en el modelo APP/PS1KI, y Levi *et al.* (2003, 2007) en el modelo de ratón de AD con la ApoE4, tampoco encuentran efectos positivos del EA sobre los déficits de memoria de trabajo.

La mayoría de estudios sobre los modelos transgénicos para el AD se centran en la evolución de la neuropatología y los déficits cognitivos de los ratones. Si bien no existe demasiada literatura sobre las alteraciones emocionales (o síntomas BPSD) que presentan los diversos modelos de ratón transgénicos para el AD, algunos estudios muestran alteraciones en los niveles de actividad exploratoria/locomotora en estos modelos. Más escasos aun son los trabajos que estudian los efectos del EA sobre la conducta ansiosa/temerosa de los animales transgénicos, y las conclusiones son dispares.

Encontramos que, en algunas cepas de ratón transgénicas para el AD, como es el caso del modelo 3xTgAD, el tratamiento de EA puede tener efectos beneficiosos sobre el eje HPA, ya que se ha observado que produce una disminución de los elevados niveles de corticosterona plasmática basal que presentan los machos 3xTgAD (Arranz *et al.*, 2011; ver en apartado 5.3. "Discusión Estudio II" Figura 5.50.). En línea con lo comentado, García-Mesa *et al.* (2011) observaron que la administración de ejercicio voluntario (uno de los componentes del tratamiento de EA) producía una disminución en los niveles de ansiedad en animales 3xTgAD de 7 meses de edad en el test de la Caja blanca-y-negra, e incrementaba la conducta exploratoria en la Tabla de agujeros. Dichos efectos venían acompañados por una disminución en los niveles de estrés oxidativo, sin alterar los pequeños depósitos de β A y Tau que empezaban a formarse en las estructuras cerebrales de los ratones 3xTgAD a

esa edad. En concordancia con estos resultados, Görtz *et al.* (2008), utilizando hembras TgCRND8 tratadas con EA desde la edad de 1 mes, observaron que el tratamiento incrementaba la actividad exploratoria y locomotora en el Campo abierto y el “*Barrier test*”, al tiempo que disminuía la ansiedad en el Laberinto en cruz elevado.

Sin embargo, estudios en otras cepas de ratón transgénicas muestran efectos del EA sobre la temerosidad contrarios a los comentados. Así por ejemplo, Cotel *et al.* (2010), que administraron el tratamiento de EA a hembras APP/PS1KI de 2 meses de edad, observaron que a los 6 meses los ratones enriquecidos no mejoraban los déficits cognitivos en la memoria de trabajo, no habían cambios en los niveles de ansiedad que caracterizan a esta cepa transgénica, y tampoco variaciones en la deposición amiloide ni en la neurogénesis hipocampal. De hecho el único efecto que encuentran es un incremento en la degeneración axonal, sugiriendo que una intervención como el EA no es suficiente para prevenir procesos neuropatológicos típicos de la enfermedad de Alzheimer (ver Tabla 2.3. más adelante).

Como ya hemos comentado, la mayoría de estudios sobre los efectos del EA en modelos de ratón transgénicos para el AD están principalmente enfocados al estudio de la evolución de la neuropatología, y sólo en algunos casos a las mejoras producidas en los déficits cognitivos que presentan los animales. Así, a continuación, comentaremos dos de las posibles causas conocidas que constituyen el substrato de la mejora cognitiva observada en los animales transgénicos tratados con EA: los efectos sobre la neurogénesis y la disminución de la deposición amiloide.

2.5.3.2. Efectos sobre la neurogénesis

Los mecanismos por los que el EA atenúa el declive de las funciones cognitivas, en los diversos modelos de ratón transgénicos para el AD, todavía hoy se desconocen. Sin embargo, se ha sugerido que el efecto del EA sobre las funciones cognitivas podría deberse, al menos en parte, a una mejora de la plasticidad sináptica (representada por fenómenos como la LTP) y/o un incremento de la neurogénesis (Hu *et al.*, 2010; Wolf *et al.*, 2006).

Como hemos comentado anteriormente, una de las características patológicas importantes que se da en los modelos de ratón para el AD es la alteración que se produce en la neurogénesis, especialmente en el hipocampo (p. ej. Crews *et al.*, 2010; Rodríguez *et al.*, 2008). Tanto en el envejecimiento normal como en el AD, aunque de forma más acelerada en este último, se produce un declive progresivo de la capacidad regenerativa de las células madre que se acabarán diferenciando en neuronas y glía, con el objetivo de reparar los daños producidos en el cerebro por el paso del tiempo (Lister y Barnes, 2009; Sharpless *et al.*, 2007). El dramático declive en la neurogénesis incrementa los déficits de aprendizaje y memoria, además de empeorar la percepción sensorial olfatoria en algunos modelos de ratón con AD (Guérin *et al.*, 2009; Lazarov *et al.*, 2010b; Wesson *et al.*, 2010;).

En cuanto a los efectos del enriquecimiento ambiental (y el factor de actividad física que incluye), se ha demostrado que dicho tratamiento es un regulador positivo de la neurogénesis en ratones adultos (Kempermann *et al.*, 1997; Kronenberg *et al.*, 2006; van Praag *et al.*, 1999a, 2008). El incremento de la actividad física durante el EA es un factor muy relevante, de modo que la neurogénesis inducida por el ejercicio correlaciona con una mejora en el aprendizaje y la memoria de los animales (van Praag *et al.*, 1999b, 2008). Así, en la mayoría de estudios y en diversos modelos de ratón transgénico para el

AD, el EA incrementa la neurogénesis (p. ej. Herring *et al.*, 2009; Hu *et al.*, 2010; Lazarov *et al.*, 2010; Mirochnic *et al.*, 2009; Wolf *et al.*, 2006).

Si bien son una minoría, existen también resultados contradictorios en algunos modelos murinos. Por ejemplo, en los modelos de ratón transgénicos para la PS1, el enriquecimiento no incrementa la neurogénesis, posiblemente debido al efecto de determinados factores solubles liberados por la microglia (Choi *et al.*, 2008; Feng *et al.*, 2001). Y en el ratón transgénico para la APOE4, el enriquecimiento reduce la neurogénesis (Levi y Michaelson, 2007).

Por tanto, podemos concluir que los efectos del enriquecimiento ambiental varían de forma amplia según el modelo animal de AD del que se trate (y de sus características genéticas), y parece ser que también dependen de la oportunidad de realizar actividad física durante el enriquecimiento.

2.5.3.3. Efectos sobre la patología amiloide

En general, aunque la literatura más reciente indica que, tras un tratamiento de EA, la recuperación del declive cognitivo que presentan los ratones transgénicos va acompañada de una reducción de la deposición amiloide, como veremos a continuación existen también resultados contradictorios.

Jankowsky *et al.* (2003) fueron de los primeros en estudiar los efectos del EA en un modelo de ratón transgénico para el AD (APP/PS1). Los resultados obtenidos fueron paradójicos, ya que los ratones transgénicos enriquecidos, desarrollaron una mayor deposición amiloide (mayor β A agregada y total), comparada con las camadas transgénicas estabuladas en condiciones estándar, sugiriendo que el EA podría activar procesos que incrementasen la carga amiloide en animales transgénicos. En un estudio posterior, los ratones

transgénicos estabulados en condiciones de EA mostraron una mejora en la ejecución de la tarea de aprendizaje en el Laberinto acuático de Morris, a pesar de seguir mostrando las placas neuríticas en el hipocampo y niveles basales de β A elevados (Jankowsky *et al.*, 2005). Estos resultados apoyan estudios similares *in vitro*, que demuestran que la actividad sináptica incrementa la producción de β A y derivados solubles de la APP (Cirrito *et al.*, 2005, 2008).

En contraste con estos hallazgos, Lazarov *et al.* (2005) hallaron que los animales transgénicos APP/PS1 enriquecidos habían reducido los depósitos amiloides corticales e hipocampales, en comparación con los transgénicos estabulados en condiciones estándar. Además, la actividad enzimática de la Nephilysin (una endopeptidasa que degrada la β A) era elevada en cerebros de ratones enriquecidos y correlacionaba inversamente con la carga amiloide.

La discrepancia entre los resultados obtenidos por Jankowsky *et al.* (2003) y Lazarov *et al.* (2005) ha sido un importante punto de discusión. El estudio original realizado por Jankowsky *et al.* (2003) incluía añadir y quitar sujetos de los grupos de enriquecimiento durante el estudio, aumentando la posibilidad de incrementar el estrés de éstos. Sin embargo, los autores trataron este punto en estudios posteriores, y destacaron que incluso utilizando otra cepa de ratón se seguía produciendo un incremento en la β A y la deposición de placas tras el EA (Jankowsky *et al.*, 2005). También se sugirió que la disparidad en los resultados obtenidos entre ambos estudios podía ser debida tanto al género de los ratones (ya que Lazarov *et al.* utilizaron machos, mientras que Jankowsky *et al.* usaron hembras), como a la diferencia en el número de “ruedas para correr” disponibles en las jaulas y el paradigma de enriquecimiento por sí mismo (Jankowsky *et al.*, 2005).

Actualmente, el rol exacto de los niveles y la deposición de β A en el AD, así como su impacto en la función cognitiva, todavía no ha sido completamente aclarado, y por tanto es difícil interpretar los resultados de la diferencia en los

niveles de amiloide como consecuencia del enriquecimiento ambiental. Si bien, Lazarov *et al.* (2005) no examinaron los efectos del EA en el comportamiento cognitivo, Jankowsky *et al.* (2005) mostraron que a pesar del incremento en la expresión de las placas amiloides hipocampales, el EA mejoraba el déficit de memoria espacial dependiente del hipocampo. Por tanto, el EA tuvo un efecto beneficioso en la función cognitiva, independientemente del aumento de los niveles de amiloide. Acorde con este hecho, Arendash *et al.* (2004) observaron que los ratones transgénicos para el APP tratados con EA mostraban una mejora cognitiva en cuanto a aprendizaje espacial, pero ningún cambio en la deposición de βA en comparación con los ratones estabulados en condiciones estándar. Wolf *et al.* (2006) y Mirochnic *et al.*, (2009) obtuvieron los mismos resultados que Arendash *et al.* (2004). El grupo de Wolf *et al.* (2006), tras realizar el tratamiento de EA en un modelo de ratón transgénico con APP-23, observó como los ratones mostraban una mejora cognitiva a pesar de mantener las placas de βA . En cambio, los ratones sí mostraban niveles más elevados de los factores neurotróficos NT-3 y BDNF, así como un incremento de la neurogénesis en el hipocampo. A su vez, Mirochnic *et al.* (2009) observaron como el EA junto con el ejercicio disminuían la proporción de $\beta A_{42}/\beta A_{40}$ en el hipocampo de un ratón con APP-23, también sin producir cambios en las placas amiloides (para efectos cognitivos del ejercicio físico, ver también Adlard *et al.*, 2005; Nichol *et al.*, 2009; Marx *et al.*, 2005).

A pesar de los resultados aportados por estos trabajos, como hemos comentado, la mayoría de estudios señala que el EA produce un efecto de reducción de la deposición amiloide. Así, encontramos por ejemplo el trabajo de Costa *et al.* (2007), donde observaron que el enriquecimiento ambiental en ratones dobles transgénicos APP/PS1 por sí sólo no producía cambios, pero cuando los animales enriquecidos además habían pasado por una batería conductual (intensificando el efecto del EA), los cerebros de estos ratones transgénicos mostraban un 50% menos del péptido βA . Este efecto iba acompañado de un aumento, en el hipocampo, de la expresión de genes y

proteínas relacionadas con el secuestro del péptido β A y de la plasticidad sináptica. Indicando, por tanto, que el enriquecimiento ambiental podría proteger del deterioro cognitivo relativo al AD mediante un mecanismo dual, el cual incluiría mecanismos tanto dependientes como independientes de los cambios en la deposición de la amiloide (Costa *et al.*, 2007). Por otra parte, Herring *et al.* (2009) observaron como ratones TgCRND8 (expresaban una doble mutación para la APP) que fueron estabulados durante 5 meses con “ruedas para correr” (recordemos que el ejercicio es uno de los factores que habitualmente componen el EA), mostraron una mejora en la velocidad de aprendizaje en el Laberinto acuático de Morris y una disminución en la expresión de las placas de β A. Sugiriendo que este efecto podría estar relacionado con los cambios del metabolismo neuronal, los cuales se sabe que afectan al procesamiento de la APP y, asimismo, son regulados por el ejercicio.

En línea con los resultados beneficiosos del EA sobre la patología amiloide y las funciones cognitivas, estarían la mayoría de estudios. Este sería el caso del trabajo de Cracchiolo *et al.* (2007) con el modelo PS1/PDAPP, en que la administración de EA redujo la deposición amiloide, además de proteger contra el deterioro cognitivo. En concordancia con este estudio, Berardi *et al.* (2007) también observaron que el tratamiento de EA, además de prevenir el inicio del déficit cognitivo, disminuyó la formación de depósitos amiloides en el modelo AD11, si bien no se redujo la formación de ovillos de Tau hiperfosforilada en la corteza. Pardon *et al.* (2009) también observan que el EA previene de la acumulación de β A, además de mostrar leves mejoras cognitivas en el modelo TASTPM (que contiene los transgenes APP y PS1).

Otros trabajos, centrados únicamente en el estudio de la evolución de la neuropatología, también indican que el tratamiento de enriquecimiento ambiental disminuye la formación de placas amiloides. Dicha disminución se produce bien porque hay una menor deposición, porque disminuye la ratio β A₄₂/ β A₄₀, o bien porque se incrementa la expresión de proteínas que se

encargan de la limpieza del péptido amiloide (mediante la Nephilysin, Transthyretin, etc.). Así, Mirochnic *et al.* (2009), a pesar de no encontrar una disminución en los depósitos de βA , observan una disminución de la ratio $\beta A_{42}/\beta A_{40}$ en el modelo APP23. Herring *et al.* (2011) y Hu *et al.* (2010) también observan que el EA disminuye la formación de placas amiloides en los modelos TgCRND8 y APP_{swe}/PS1 Δ E9, respectivamente, además de atenuar la patología Tau en el modelo APP_{swe}/PS1 Δ E9. Y Lahiani-Cohen *et al.* (2011) encuentran que el EA disminuye los niveles de Tau en modelo transgénico E257K/P301S-Tau-Tg para dicha proteína, además de observar mejoras cognitivas.

Con el objetivo de resumir los últimos hallazgos sobre los efectos de enriquecimiento ambiental en diversos modelos de ratón para la enfermedad de Alzheimer, a continuación presentamos una tabla resumen de los principales efectos encontrados en diferentes modelos transgénicos (Tabla 2.3.), en función del género con el que se ha trabajado y del tipo de procedimiento llevado a cabo.

Tabla 2.3. (1a parte)

Referencias	duración EA	rueda	inicio EA	modelo animal	sexo	inicio test	Test conductuales	Efectos sobre la neuropatología, la cognición y la ansiedad. Otros efectos.
Herring <i>et al.</i> , 2011	2m	si	3 mo	TgCRND8	♀	5 mo	∅	↓ βA, ↑ mecanismos de defensa anti-oxidativos.
Lahiani-Cohen <i>et al.</i> , 2011	x	x	x	E257K/P301S-Tau-Tg	x	x	x	↓Tau, ↑ BDNF Mejora las tareas cognitivas.
Lazarov <i>et al.</i> , 2010	x	x	x	x	x	x	x	↑ neurogénesis. Mejora el aprendizaje y la memoria.
Cotel <i>et al.</i> , 2010	4m	si	2 mo	APP/PS1KI	♀	6 mo	SMT, Y-maze, PM	Igual βA en hipocampo (pérdida neuronal en CA1) y base de la médula espinal. ↑ degradación axonal. No mejora la memoria de trabajo. No recupera los niveles bajos de ansiedad. Recuperación parcial de déficits motores.
Hu <i>et al.</i> , 2010	1 m	si	día 21	APP _{3swg} /PS1ΔE9	♂	2 mo	x	↓ βA (hipocampo y corteza). Atenúa la patología Tau. ↑ neurogénesis, n° astrócitos, LTP en hipocampo.
Richter <i>et al.</i> , 2010	20 días	si	3 mo	TgCRND8	♂	101 días – 5 mo	OR, Barnes test	No mejora la neuropatología. A más ejercicio más depósitos amiloides (es la consecuencia, no la causa). No mejora la función cognitiva.
Herring <i>et al.</i> , 2010	4 m	si	día 30	TgCRND8 (APP)	♀	5 mo	x	↓ estrés oxidativo. Induce la defensa oxidativa.
Mirochnic <i>et al.</i> , 2009	1 m	no	6 / 18 mo	APP23	♀	6 / 18 mo	x	Igual βA. EA disminuye la ratio Aβ1-42/Aβ-1-40. ↑ neurogénesis (el ejercicio no produce = efecto).
Herring <i>et al.</i> , 2009	4m	si	día 30	TgCRND8 (APP)	♀	5 mo	OR, PM	↑ neurogénesis, ↑ dendrificación y sinaptogénesis (hipocampo)
Pardon <i>et al.</i> , 2009	1m	no	4 mo	TASTPM (APP+PS1)	♂	5 mo	Peso, actimetría, SCC	Previene la acumulación de βA (hipocampo y corteza prefrontal), mismos niveles de endocannabinoides (hipocampo y corteza). Prevención del inicio del déficit de memoria a corto plazo; sin cambios en la extinción. Estrés: ↑ defecaciones.

Tabla 2.3. (2a parte)

Referencias	duración EA	rueda	inicio EA	modelo animal	sexo	inicio test	Test conductuales	Efectos sobre la neuropatología, la cognición y la ansiedad. Otros efectos.
Görtz <i>et al.</i> , 2008	x	si	1 mo	TgCRND8 (APP)	♀	4,5 mo	OF, PM, OR, Barnes test	↓ βA, ↓ ansiedad en el PM ↑ actividad locomotora y exploratoria
Herring <i>et al.</i> , 2008	4m	x	1 mo	TgCRND8 (APP)	x	x	x	↑ limpieza de βA, ↑ angiogénesis. ↑ neurogénesis y plasticidad neural en hipocampo.
Berardi <i>et al.</i> , 2007	5 m	si	2 mo	AD11	♂+♀	7 y 12 mo	OR, MWM	↓ βA (hipocampo). No reduce la Tau en corteza. Previene la pérdida de neuronas colinérgicas (ambos sexos) y el inicio del déficit de memoria a los 7 mo.
Cracchiolo <i>et al.</i> , 2007	8 m	si	1.5 mo	APP y APP+PS1	♂+♀	8 mo	SMT, ansiedad y cognición	↓ βA (hipocampo). Protección contra el deterioro cognitivo (WM, RM, R/I). Diferencia en los niveles hormonales de α y β
Levi y Michaelson <i>et al.</i> , 2007	5 m	si	día 21	APP _{Swe} /PS1ΔE9 (ApoE3 y ApoE4)	♂	6 mo	T-maze	No mejora cognitiva en ApoE4. ↓ neurogénesis en hipocampo (giro dentado únicamente, no en zona subventricular). Induce apoptosis neuronal en ApoE4.
Wolf <i>et al.</i> , 2006	9 m	si	2.5 mo	APP23	♀	11 mo	MWM, rotaroad test	Igual βA. ↑ expresión de neurotrofinas NF-3 y BDNF. ↑ neurogénesis (hipocampo). Mejora el aprendizaje y la memoria.
Costa <i>et al.</i> , 2007	4.5 - 6 m	si	día 21	PS1/PDAPP	♂+♀	4.5 - 6 mo	Y-maze, MWM, circular, P, P recog., RAWM	↓ βA (EA+testing. Mismo efecto en ambos sexos), ↑ plasticidad neural. EA+ testing: efectos positivos sobre la memoria.
Jankowsky <i>et al.</i> , 2005	6 m	si	2 mo	APP _{Swe} /PS1ΔE9	♀	8 mo	RAWM, MWM	↑ niveles de βA40 y βA42. Mejora los déficits de aprendizaje y memoria.
Lazarov <i>et al.</i> , 2005	5 m	si	1 mo	APP _{Swe} /PS1ΔE9	♂	6 mo	∅	↑ βA (depósitos y forma soluble), ↑ neprilina, ↑ expresión de genes de aprendizaje y memoria.
Arendash <i>et al.</i> , 2004	4 m	x	16 mo	APP _{Swe}	X	20-22 mo	RAWM, MWM	Igual βA. Mejora la función cognitiva.

Tabla 2.3.- Resumen de los últimos estudios sobre los efectos del EA en distintos modelos de ratones transgénicos para el AD. **Duración EA:** duración del EA; **rueda:** presencia/ausencia de rueda de correr; **inicio EA/test:** inicio del tratamiento de EA/test; **x/no** especificado por el autor; **∅:** no realizan test; **m/mo:** meses/meses de edad; **SMT:** batería sensorio-motora; **Y-maze:** Laberinto en Y; **PM:** Laberinto en cruz elevado; **OR:** Reconocimiento de objetos; **OF:** Campo abierto; **SCC:** Test de condicionamiento por miedo al contexto; **MWM:** Laberinto acuático de Morris; **RAWM:** Laberinto acuático de brazos radiales; **WM:** Memoria de trabajo; **RM:** Memoria de referencia; **R/I:** Reconocimiento/Identificación; ↓: disminución; ↑: aumento; ↓βA/Tau: disminución de la deposición de βA o de la formación de ovillos de Tau. En sombreado se destacan los efectos negativos o neutros del EA.

Objetivos e Hipótesis

3. PLANTEAMIENTO, OBJETIVOS E HIPÓTESIS

3.1. PLANTEAMIENTO

La validación de un análogo animal para la enfermedad de Alzheimer requiere que el modelo manifieste el perfil neuropatológico y cognitivo característico de la enfermedad en humanos, y además pueda ser reproducible por diversos laboratorios. Por otro lado, los síntomas neuropsiquiátricos (BPSD) del AD han sido poco estudiados en los modelos animales existentes, a pesar de que son los que aparecen en las fases más tempranas del desarrollo de la enfermedad, y parece ser que son previos a la aparición de la patología β A (LaFerla *et al.*, 2010).

Los ratones triple transgénicos 3xTgAD (modelo animal creado en el 2003 por el grupo de LaFerla *et al.*, en California, USA y cedidos a nuestro laboratorio en el 2004) parecen ser uno de los mejores modelos animales para el estudio de la enfermedad de Alzheimer, así como para el modelado de procesos neurodegenerativos acelerados (Billings *et al.*, 2005; Oddo *et al.*, 2003a-b). De este modo, tal como indicaban diversos trabajos al inicio del presente estudio (p. ej. Billings *et al.* 2005, LaFerla y Oddo, 2005), se esperaría que estos animales mostrasen alteraciones en paradigmas de funciones cognitivas, de aprendizaje y memoria espacial, y posiblemente síntomas BPSD, que fuesen acusándose a medida que progresase la neuropatología.

El presente estudio forma parte de un proyecto más amplio, financiado por el Ministerio de Educación y Ciencia (SAF2006-13642), EME2005-140267, EME2006-140335, DGR (2005SGR-00885), y la Swedish Alzheimer's Foundation, cuyo objetivo principal es estudiar los efectos de los tratamientos de enriquecimiento ambiental y estimulación postnatal, aplicados en diferentes edades, sobre los déficits cognitivos y alteraciones

emocionales/conductuales, así como los mecanismos neurales subyacentes en este modelo de ratón 3xTgAD.

En resumen, en el marco de dicho proyecto, en el presente trabajo se pretende valorar si el tratamiento de EA puede prevenir o retardar la aparición de fenómenos asociados a la neuropatología de la enfermedad de Alzheimer en el modelo de ratón 3xTgAD, como, por ejemplo, las alteraciones cognitivas y emocionales (estudio en el que se centra esta tesis doctoral), el estrés oxidativo cerebral y la acumulación de β A intraneuronal, así como la formación de placas extraneuronales, la patología Tau, la pérdida de plasticidad sináptica hipocámpica y la alteración de la función de diversos sistemas de neurotransmisión. Los estudios que se refieren a la parte neuroinmunitaria, celular y molecular de esta investigación, no obstante, forman parte de otros trabajos de miembros del grupo de investigación y asociados (ver p. ej. Arranz *et al.*, 2011; García-Mesa *et al.*, 2011, 2011b; España *et al.*, 2010).

Según los estudios publicados con anterioridad al inicio de esta tesis doctoral, los ratones transgénicos 3xTgAD manifestaban sutiles déficits cognitivos a la edad de 4 meses. Así según Billings *et al.* (2005), a esta edad los ratones 3xTgAD sólo presentaban algún déficit de memoria espacial a largo plazo, manifestándose únicamente en ciertas variables de pruebas de memoria realizadas a las 24 horas de la adquisición de una tarea de aprendizaje espacial o de la adquisición de un condicionamiento de miedo a un contexto espacial (Billings *et al.*, 2005). Los autores proponían que estos déficits tempranos en la retención podrían estar relacionados con la presencia intraneuronal de β A, presente ya a la edad de 4 meses en hipocampo, considerado un marcador biológico potencial de inicio de la AD (Billings *et al.*, 2005). Sin embargo, respecto a la evaluación de procesos no cognitivos, o BPSD, hasta 2006 no se había publicado ningún estudio con los ratones transgénicos 3xTgAD. Por tanto, la cuestión de cómo eran los perfiles de comportamiento de los ratones 3xTgAD en pruebas de novedad, de ansiedad/temerosidad, y de exploración,

no estaba resuelta, siendo evidente la necesidad de ulteriores estudios para clarificar el perfil de BPSD en este modelo de ratón transgénico.

Por otra parte, los estudios epidemiológicos que encontrábamos hasta el momento apuntaban a una mayor incidencia del AD en mujeres que en hombres, debido en parte a la mayor longevidad del género femenino (Sinforiani *et al.*, 2010; De Deyn *et al.*, 2011; Fratiglioni *et al.*, 1997; Viña *et al.*, 2010). Los trabajos con el modelo 3xTgAD llevados a cabo por Billings *et al.* (2005) se habían llevado a cabo exclusivamente con ratones macho, de modo que se decidió que era de interés incorporar al estudio ratones hembras para conocer las diferencias de género que se daban en el desarrollo de la enfermedad, así como los posibles efectos diversos del tratamiento de enriquecimiento según el género de los ratones.

Por lo que respecta a la modificación o reversión de déficits cognitivos, o alteraciones conductuales características de la demencia en el modelo 3xTgAD, mediante la aplicación de tratamientos ambientales, todavía no se habían publicado estudios al inicio de esta tesis. No obstante, dada la evidencia revisada en las secciones anteriores, relativa a los efectos del enriquecimiento ambiental sobre procesos emocionales, cognitivos y de plasticidad neural, en diversas cepas de ratas y ratones, parecía lógico esperar que este tratamiento pudiese ejercer un papel protector (p. ej. Chapillon *et al.*, 1999, 2002; Escorihuela *et al.*, 1994b, 1995a; Fernández-Teruel *et al.*, 1997, 2002; Kempermann *et al.*, 1998a) frente a los déficits cognitivos y las alteraciones conductuales que pudiesen aparecer en los ratones 3xTgAD.

Para la caracterización del perfil conductual y cognitivo de este modelo, así como de los efectos del tratamiento de enriquecimiento ambiental, y basándonos en la experiencia previa de nuestro laboratorio (Chadman *et al.*, 2009; Crawley, 1985; Escorihuela *et al.*, 1994b, 1995b; Giménez-Llort *et al.*, 2002), en el presente trabajo utilizamos pruebas que ya son clásicas en

roedores, como serían: **i)** el Laberinto acuático de Morris para la evaluación de las capacidades cognitivas en tareas de aprendizaje y memoria (ver p. ej. Escorihuela *et al.*, 1995b; Morris, 1981, 1984, 1986; Whishaw 1995); **ii)** el test de Campo abierto para evaluar la reactividad emocional de los animales en una situación de novedad, a través de la conducta exploratoria vertical y horizontal, así como **iii)** el Laberinto en cruz elevado, o **iv)** la Caja blanca-y-negra, para valorar perfiles de ansiedad/miedo. También utilizamos pruebas como **v)** la Tabla de 16 agujeros de Boissier o la Tabla de 4 agujeros, para medir la conducta exploratoria y “curiosidad” de los animales (ver detalles de baterías de test similares en p. ej. Escorihuela *et al.* 1995b; Fernández-Teruel *et al.*, 1991; Giménez-Llort *et al.*, 2002, 2005), y **vi)** pruebas sensorio-motoras para comprobar las capacidades físicas de los animales en las distintas edades.

Cabe decir que, posteriormente a la realización de este trabajo, sería interesante comparar los efectos de la administración del enriquecimiento ambiental cuando se inició el tratamiento en la edad adulta de los ratones 3xTgAD (en el presente trabajo se administra el EA a los 6 meses de edad) con los efectos de mismo tratamiento llevado a cabo en la fase pre-patológica de la enfermedad (otros estudios iniciados por nuestro grupo, donde iniciamos el tratamiento a los 21 días de edad de los animales, están pendientes de completarse). De este modo se podría valorar si los efectos del EA tienen más potencia terapéutica cuando se aplican en edades más tempranas, caracterizadas por una mayor plasticidad cerebral, o si, por el contrario, el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer es suficientemente potente como para contrarrestar los efectos neurogénicos del enriquecimiento ambiental, independientemente de la edad en la que se haya aplicado el tratamiento.

3.2. OBJETIVOS

3.2.1. Estudio I

Teniendo en cuenta los antecedentes revisados, el Estudio I tiene como objetivo general la caracterización conductual del modelo de ratón 3xTgAD en estadios iniciales de la neuropatología, en animales de la colonia española establecida en nuestra Unidad desde mediados del año 2004. En este estudio, intentaremos replicar los datos obtenidos a nivel cognitivo en la colonia madre americana (Billings *et al.*, 2005), y completar la caracterización de este modelo con nuevos datos referentes a los síntomas neuropsiquiátricos de la demencia (BPSD). De este modo, el Estudio I tiene como objetivo concreto:

1. La caracterización conductual a nivel cognitivo (aprendizaje y memoria) y emocional (o BPSD) de los ratones machos 3xTgAD, en etapas tempranas del desarrollo de la enfermedad/neuropatología. Las edades que serán caracterizadas son:
 - 2.5 meses: fase pre-patológica de la enfermedad, con leve acumulación de β A intraneuronal localizada en la corteza de los ratones 3xTgAD.
 - 6 meses: fase en que la β A intraneuronal se encuentra localizada en la corteza e hipocampo de los 3xTgAD. Inicio de la deposición extracelular de β A en la corteza. Se pretende corroborar los resultados de Billings *et al.* (2005) que detectan alteraciones en la memoria a largo plazo de los ratones 3xTgAD, además de caracterizar por primer vez la conducta de los animales 3xTgAD a nivel emocional (BPSD).

3.2.2. Estudio II

El Estudio II tiene como objetivo general la caracterización conductual del modelo 3xTgAD en etapas avanzadas de la neuropatología/enfermedad, cuando la patología β A y Tau ya están ampliamente desarrolladas; además de la evaluación de los diferentes efectos del enriquecimiento ambiental para cada una de las dos edades elegidas (estudio longitudinal llevado a cabo a los 12 y 15 meses), así como para cada uno de los sexos. De este modo, los objetivos concretos de este estudio fueron:

1. La caracterización conductual a nivel cognitivo (aprendizaje y memoria) y emocional (o BPSD) de los ratones 3xTgAD, en etapas avanzadas del desarrollo de la enfermedad. Las edades de los animales son:
 - 12 meses: fase en la que se encuentran depósitos de β A extracelulares dispersos por la corteza e hipocampo de los ratones 3xTgAD, y en la que se inicia la formación de ovillos intraneuronales de proteína Tau hiperfosforilada en el hipocampo (Oddo *et al.*, 2003a).
 - 15 meses: fase en la que se encuentran depósitos de β A extracelulares además de ovillos intraneuronales de Tau hiperfosforilada, dispersos por la corteza e hipocampo de los ratones 3xTgAD (Oddo *et al.*, 2003a).
2. Valoración de las diferencias sexuales en el perfil cognitivo y emocional, a los 12 y posteriormente a los 15 meses de edad de los ratones 3xTgAD.
3. Evaluación de los efectos “terapéuticos” del tratamiento de enriquecimiento ambiental (EA, iniciado a los 6 meses de edad de los ratones 3xTgAD) a nivel cognitivo y emocional, a los 12 y a los 15

meses de edad de los ratones 3xTgAD. Y observación de diferencias de género en el efecto del EA.

3.3. HIPÓTESIS

Las hipótesis concretas subyacentes a este planteamiento, y propuestas para el desarrollo de esta tesis fueron:

1. La colonia de ratones 3xTgAD, desarrollada en nuestro laboratorio a partir de dos parejas de progenitores de cada cepa (NTg y 3xTgAD), sería esperable que replicase los resultados de Billings *et al.* (2005) en cuanto a déficits cognitivos, de modo que:
 - A los 2.5 meses, cuando todavía no se ha detectado inmunoreactividad a la β A intraneuronal (Oddo *et al.*, 2003a), los ratones 3xTgAD no deberían mostrar alteraciones en el aprendizaje y la retención de la tarea del Laberinto acuático de Morris.
 - A los 6 meses, cuando ya existe β A intraneuronal en el hipocampo y la corteza (Oddo *et al.*, 2003a) y déficits de LTP, esperaríamos encontrar déficits en el aprendizaje espacial y la retención del mismo en el MWM.
 - A pesar de que al inicio del presente trabajo todavía no se habían estudiado las alteraciones emocionales (BPSD) que podían presentar los ratones 3xTgAD, dada la evolución de la neuropatología en las edades comentadas (2.5 y 6 meses), esperaríamos encontrar leves alteraciones de ansiedad/temerosidad únicamente a la edad de 6 meses.

2. Teniendo en cuenta el desarrollo de la neuropatología en ratones 3xTgAD a los 12 y 15 meses (en los que se ha descrito la presencia de placas amiloides extendidas por el hipocampo y la corteza, sumado al desarrollo de los ovillos neurofibrilares en ambas estructuras a los 15 meses; Oddo *et al.*, 2003a-b), esperaríamos que los ratones 3xTgAD mostrasen claros déficits cognitivos de aprendizaje y memoria espacial, a corto y largo plazo, y de memoria de trabajo en ambas edades en el MWM.
3. Dado que la deposición amiloide, y la formación de ovillos a los 12 y 15 meses, se producen en estructuras que están implicadas en las funciones emocionales como son el hipocampo y la amígdala (además de la corteza), esperaríamos encontrar claras alteraciones emocionales en los ratones 3xTgAD. El sentido de dichas alteraciones no era posible predecirlo al inicio de este estudio, al no existir trabajos previos relacionados.
4. Además, teniendo en cuenta que se trata de un estudio longitudinal, esperaríamos encontrar una cierta “*transferencia*” de información a largo plazo en los animales de ambos genotipos entre los 12 y los 15 meses (en aquellos test que repetimos a ambas edades), y dicha transferencia de información debería ser de mayor magnitud en los animales NTg que en los 3xTgAD.
5. Dados los antecedentes de otros trabajos en los que se administró un tratamiento de enriquecimiento ambiental en ratones transgénicos para el AD (p. ej. Arendash *et al.* 2004; Jankowsy *et al.* 2003), y vistos los efectos beneficiosos del tratamiento sobre las funciones cognitivas de los animales, esperaríamos encontrar mejoras en las tareas de aprendizaje y memoria, así como la normalización de posibles alteraciones emocionales que pudiesen mostrar los ratones 3xTgAD.

6. Si bien los trabajos de enriquecimiento ambiental en los que se estudian ambos sexos son escasos, en general indican que existen diferencias en los efectos del EA entre machos y hembras (p. ej. Peña *et al.*, 2006), además de que la neuropatología en el AD también manifiesta diferencias de género (p. ej. Barnes *et al.*, 2005; Peskind *et al.*, 1996). De modo que esperaríamos encontrar diferencias de género en cuanto a las alteraciones cognitivas y emocionales, y posiblemente efectos del EA divergentes en función del sexo.

Estudio I

4. ESTUDIO I

Caracterización del perfil cognitivo y BPSD en estadios iniciales del AD, en ratones 3xTgAD de 2.5 y 6 meses de edad

4.1. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1.1. Sujetos experimentales

Los animales utilizados fueron machos de la colonia de ratones 129/C57BL6 triple transgénicos 3xTgAD homocigotos y no transgénicos (NTg), creada en julio del 2004 en la Unidad de Psicología Médica (UAB), del Instituto de Neurociencias, a partir de progenitores recibidos del laboratorio del Dr. Frank LaFerla, del Depto. de Neurobiología y Conducta de la Universidad de California, Irvine, EEUU.

Los animales fueron estudiados a los 2.5 y 6 meses, edades elegidas a partir de los estadios neuropatológicos descritos por Oddo *et al.* (2003b). Los dos meses de edad se caracterizan por la ausencia de inmunoreactividad a la β A tanto a nivel intra- como extracelular. A los 6 meses de edad, los animales muestran inmunoreactividad a la β A intracelular, además de déficits sinápticos (LTP) y colinérgicos en el hipocampo y la corteza (Oddo *et al.*, 2005), coincidiendo con las regiones cerebrales donde hay acumulación de β A intracelular. Los genotipos fueron confirmados mediante PCR de biopsias de colas en el Instituto Karolinska.

Los animales del mismo genotipo fueron mantenidos en grupos de 2 o 3, en jaulas de macrolón (35 x 35 x 25cm), bajo condiciones estándares de laboratorio (agua y comida *ad libitum*, $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ de temperatura, 50-70% de

humedad, 12 horas de luz/oscuridad con inicio a las 08:00h) y los experimentos se llevaron a cabo entre las 10h y las 13h. El número de animales por grupo evaluados a los 2.5 meses fue de n=13 para NTg y 3xTgAD; y a los 6 meses: n=13 para NTg, n=17 para 3xTgAD.

Todos los procedimientos experimentales descritos a continuación fueron previamente aprobados por el “Comité de ética para la experimentación animal y humana” de la Universidad Autónoma de Barcelona (CEEAH), y toda la investigación se llevó a cabo bajo la legislación española sobre “Protección de animales utilizados para la experimentación y otros fines científicos” y de conformidad con la Directiva de la Unión Europea (UE 08-88) sobre este tema.

4.1.2. Estudios conductuales

La batería de tests utilizada para realizar el fenotipado conductual, basada en trabajos previos llevados a cabo en nuestro laboratorio (Escorihuela *et al.*, 1995b; Fernández-Teruel *et al.*, 1997; Giménez-Llort *et al.*, 2002) y en el trabajo de Billings *et al.* (2005), consistió en una serie de tests conductuales clásicos para la caracterización de perfiles cognitivos y conductuales de roedores. La batería se llevó a cabo en días consecutivos y se inició con paradigmas de aprendizaje y memoria espacial en el Laberinto acuático de Morris (*Morris Water Maze*, MWM), seguidos de pruebas básicas de caracterización conductual como el Campo abierto (*Open Field*, OF), el Laberinto en cruz elevado (*Plus Maze*, PM), la Tabla de 16 agujeros de Boissier (*Boissier's 16-Holes Board*, BHB), y por último la Caja blanca-y-negra (*Dark-Light Box*, DLB), los cuales permiten evaluar patrones de respuestas conductuales que incluyen conducta exploratoria y temerosidad/ansiedad.

Los animales de 6 meses de edad pasaron por toda la batería conductual indicada en la Tabla 4.1. que viene a continuación, mientras que los de 2.5 meses no pasaron por el Test de memoria sin plataforma del MWM a las 24h (RM 24h), ya que basándonos en los resultados de Billings *et al.* (2005), no esperábamos encontrar diferencias en la memoria a largo plazo en los ratones 3xTgAD a edades tan tempranas.

Cronología de la batería conductual											
Día	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Test	MWM						OF	PM	BHB	DLB	
	PT 1	PT 2	PT 3	PT 4	RM 1h30	RM 24h					

Tabla 4.1.- *Batería conductual realizada a los grupos de ratones machos de 2.5 meses (NTg: n=13 y 3xTgAD: n=13) y 6 meses de edad (NTg: n=13 y 3xTgAD: n=17). Siglas de las pruebas conductuales descritas en la sección “Abreviaturas”.*

4.1.2.1. Laberinto acuático de Morris

Los posibles déficits cognitivos de los ratones en el aprendizaje y memoria espacial, fueron evaluados mediante el Laberinto acuático de Morris (MWM), en 2 paradigmas o tareas que dependen fundamentalmente de la integridad de la función del hipocampo, área diana afectada en la enfermedad de Alzheimer por acumulación de la patología amiloide y neurofibrilar.

Los animales fueron entrenados para localizar la plataforma (de 7 cm de diámetro) en una piscina circular (71 cm de diámetro y 20 cm de profundidad, de agua opaca a 24°C) localizada en una sala negra con diversas señales visuales que ayudaban al animal a orientarse y recordar donde se encontraba la plataforma (Escorihuela *et al.*, 1995b, 1998; Morris 1984; Wishaw, 1995; Wolfer *et al.*, 1998). Los animales que no encontraban la plataforma durante los 60s que duraba el ensayo, fueron situados encima de la plataforma durante 15s, el mismo tiempo que permanecían encima los animales que lo conseguían. Todas las sesiones o ensayos fueron grabados y analizados por el sistema de análisis computerizado SMART (Panlab S.L, Barcelona, Spain).



Figura 4.1.- *Laberinto acuático de Morris.*

Días del 1 al 4: Tarea de aprendizaje espacial de referencia o Prueba de adquisición (*Place task*, PT)

El ratón fue liberado en la piscina, orientado hacia la pared, des de uno de los puntos de salida escogido al azar (orientación norte “N”, sur “S”, este “E” y oeste “W”), permitiendo que nadase hasta encontrar la plataforma (sumergida a 1.5cm bajo la superficie del agua y situada en el centro del cuadrante SE), en un tiempo máximo de 60 segundos por ensayo. Los animales que no hallaron la plataforma durante este tiempo, se colocaron sobre la plataforma durante 15 segundos.

Se realizaron 4 ensayos por día con un intervalo entre ensayos de 15 minutos. Los 4 ensayos diarios se repitieron durante 4 días, tiempo en que los 2 grupos de ratones alcanzaron valores asintóticos en la curva de aprendizaje espacial de referencia. La capacidad de recordar la localización de la plataforma se evaluó observado la latencia (o tiempo que tarda el animal) de llegada a la plataforma sumergida, la distancia recorrida y la velocidad de natación.

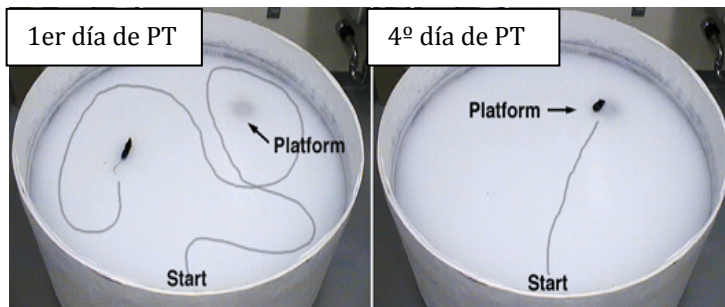


Figura 4.2.- Ejemplo de distancias recorridas por los ratones el 1er (fotografía izquierda) y 4º día (fotografía derecha) en la tarea de aprendizaje espacial de referencia.

Día 4: Test de memoria sin plataforma a la 1:30 horas (Removal 1h30, RM 1h30)

Una hora y media después de finalizar el último ensayo de la tarea de adquisición del cuarto día, la capacidad de retención (o memoria) a corto plazo) fue evaluada. La plataforma se extrajo de la piscina y el animal, que se liberó desde el cuadrante opuesto donde se encontraba la plataforma, realizó un ensayo de 60s de duración. La memoria a corto plazo se evaluó mediante el “número total de cruces” (*annulus crossings, a.c.*) que hacía el ratón en la zona donde se encontraba la plataforma en la tarea anterior (*Place task*), el “% de distancia recorrida en el cuadrante P respecto al total de los cuatro cuadrantes” (% de preferencia por el cuadrante P; siendo P donde se hallaba la plataforma en la PT), y la “distancia recorrida hasta realizar el primer a.c.”.

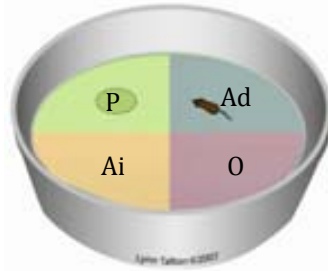


Figura 4.3.- Piscina dividida en cuadrantes mediante el programa informático SMART (Panlab S.L, Barcelona, Spain). Cuadrantes: “P” posición donde se hallaba la plataforma en la tarea de PT, “Ad” posición adyacente derecha a P, “Ai” posición adyacente izquierda a P, “O” posición opuesta a P.

Día 5: Test de memoria sin plataforma a las 24 horas (Removal 24h, RM 24h)

Para la evaluación de la memoria (o capacidad de retención) a largo plazo, se volvió a repetir el ensayo sin plataforma 24 horas después de la última sesión de adquisición. Todas las variables estudiadas en el test de memoria sin

plataforma de 1h30, se volvieron a evaluar a las 24 horas de la última sesión de adquisición.

4.1.2.2. Campo abierto

El test del Campo abierto (*Open Field*, OF) es una prueba clásica de las baterías conductuales en la que el animal se expone en un ambiente nuevo, abierto e iluminado (Crawley, 1985; Walsh y Cummins 1976). Su conducta en este espacio está determinada por el equilibrio entre el interés por la novedad natural (conducta exploratoria) de los animales y el miedo a los espacios desconocidos, abiertos e iluminados (temerosidad/ansiedad). El aparato consiste en una caja de madera blanca (55 x 55 x 25cm de altura), dividida en 25 cuadrados dibujados en la base, que permiten contabilizar los desplazamientos horizontales del animal. El ratón fue colocado en el centro del aparato y su conducta fue evaluada durante 5 minutos. Las variables que medimos fueron la actividad locomotora horizontal (número de cruces o *crossings*) y vertical (número de levantamientos o *rearings*) total, y minuto a minuto, y conductas relacionadas con la emotividad como son el número de defecaciones.



Figura 4.4.- *Test del Campo abierto*

4.1.2.3. Laberinto en cruz elevado

El Laberinto en cruz elevado (*Plus maze*, PM) es un test de ansiedad incondicionada (Pellow *et al.*, 1985, 1986; Rodgers y Dalvi, 1997) que se basa en el miedo natural a las alturas. Es una de las pruebas más utilizadas para la validación farmacológica de ansiolíticos (Pellow *et al.*, 1985). El laberinto consistía en dos brazos abiertos (*open arms*, OA: de 30 x 5cm, con el suelo negro) y dos brazos cerrados (*enclosed arms*, EA: 30 x 5 x 15cm, con paredes y suelo negro) dispuestos en cruz formando un cuadrado de 5 x 5cm en el centro, y elevado a 40cm del suelo mediante unos pies. El animal fue situado en el centro del aparato, justo en la intersección de los dos brazos, orientado hacia uno de los brazos cerrados, y su conducta fue evaluada durante 5min. Para determinar el grado de ansiedad/temerosidad de los animales se contabilizó el “tiempo pasado en cada uno de los brazos” (TOA: tiempo en los brazos abiertos o *open arms*; TEA: tiempo en los brazos cerrados o *enclosed arms*). La actividad locomotora y la temerosidad se midieron mediante el “número total de entradas” (teniendo en cuenta el criterio de las cuatro patas) que hacen los animales en los brazos abiertos, el “porcentaje de tiempo que pasan en ellos” (con la fórmula $TOA/(TOA+TEA) \times 100$) y el “número de defecaciones”.



Figura 4.5.- *Laberinto en cruz elevado*

4.1.2.4. Tabla de 16 agujeros de Boissier

El test de Boissier (*Boissier's 16-Holes Board*, BHB) es una prueba similar a la Tabla de agujeros tradicional (*Hole-Board*) pero de dimensiones más grandes (60 x 60 x 40cm de altura) y mayor número de agujeros (16 agujeros equidistantes, de 5 cm de diámetro), en el interior de los cuales se puede presentar, o no, algún objeto, con la intención de estimular la exploración de los animales (Crawley, 1985; File y Wardill, 1975). Es una prueba utilizada para medir actividad locomotora y exploratoria estudiando la conducta de los animales dirigida a los agujeros del suelo. Se considera que es indicativo de la curiosidad del animal por explorar ambientes nuevos, aunque tiene un componente de ansiedad asociado. Como en el *Hole-board*, la prueba de 5 minutos de duración, consistió en colocar el animal orientado hacia una esquina de la pared del test y valorar la conducta exploratoria desarrollada por el sujeto en torno a los agujeros a partir del “número de *head-dips*” (que son las veces que el animal introduce la cabeza en uno de los agujeros) y el “tiempo acumulado de *head-dipping*” (tiempo que el animal pasa con la cabeza dentro de los agujeros). También se contabilizaron las “defecaciones” y la “latencia de exploración”, es decir, el tiempo desde que el ratón era situado en la esquina orientado hacia la pared y explora el primer agujero. Este test también permite evaluar la memoria de trabajo a partir del “número de agujeros repetidos” explorados por el sujeto.



Figura 4.6.- Tabla de 16 agujeros de Boissier

4.1.2.5. Caja blanca-y-negra

Otro test de ansiedad que se ha convertido en todo un clásico en los últimos años es la caja de dos compartimentos blanco/iluminado y negro/oscuras que se fundamenta en la preferencia etológica de los roedores (animales nocturnos) por lugares oscuros y la aversión por los claros o iluminados (Bourin *et al.*, 2003; Ramos *et al.*, 1997). Este aparato se utiliza en diferentes versiones dependiendo del lugar en donde colocamos inicialmente el animal (en el compartimento blanco o el negro) o el tipo de iluminación que utilizamos (diversos grados). La Caja blanca-y-negra (Panlab, S.L., Barcelona, Spain) estaba constituida por dos compartimentos (negro: 27 x 18 x 27cm; blanco: 27 x 27 x 27cm) separados por una pared con una abertura (7 x 7cm) que conectaba los dos espacios. El compartimento negro estaba a oscuras, mientras que el compartimento blanco estaba ligeramente iluminado por una luz roja (bombilla de 20W, espectro no visible en roedores). Se escogieron estas condiciones de iluminación porque en estudios previos (Giménez-Llort *et al.*, 2002 y 2007; Johansson *et al.*, 2001) y también en este estudio, generaban un ambiente de adversidad media que facilitaba la entrada de los animales no transgénicos al compartimento blanco. El sujeto se colocó en el compartimento negro, de espaldas a la apertura, encarado hacia la pared y se observó durante 5 minutos. El nivel de ansiedad se evaluó mediante la “latencia de entrada con las cuatro patas” al compartimento blanco, el “número total de entradas”, el “tiempo pasado en este compartimento” y el “número de defecaciones”.



Figura 4.7.- Caja blanca-y-negra

Todas las pruebas fueron grabadas con video-cámara y posteriormente reanalizadas para la evaluación de diversas variables. Los aparatos se limpiaron con etanol diluido en agua al 5%, antes de la entrada de cada animal al test, para la eliminación de olores.

4.1.3. Análisis estadísticos

Para realizar los análisis estadísticos se utilizó el programa estadístico SPSS (versión 15.0-17.0). Los datos de ambas edades (2.5 y 6 meses de edad) fueron tratados por separado, y los resultados se expresan como media \pm error estándar de la media (SEM).

Para comparar los 2 grupos NTg vs. 3xTgAD, para cada una de las edades de manera independiente, se realizaron pruebas *T-Student* para muestras independientes para cada una de las variables obtenidas en los test del Campo abierto, el Laberinto en cruz elevado, la Tabla de 16 agujeros de Boissier y la Caja blanca-y-negra, así como en ciertos paradigmas del Laberinto acuático de Morris como la “prueba de memoria sin plataforma”. Para el análisis de la tarea de aprendizaje espacial de referencia en el Laberinto acuático de Morris, se realizó un análisis de la varianza de medidas repetidas (MANOVA) para el efecto día (factor de repetición: 4 días) de 1 factor (genotipo). Cuando estos datos se analizaron día por día independientemente, también se utilizó un análisis de la varianza de medidas repetidas MANOVA (4 “ensayo” x 2 “genotipo”) de un factor (genotipo) con medidas repetidas para el efecto “ensayo” (factor de repetición: 4 ensayos). En las interacciones estadísticamente significativas, las comparaciones entre genotipos se hicieron mediante pruebas *T-Student* como pruebas *post-hoc*. En el MANOVA, cuando no se alcanzaba la esfericidad de Mauchly, se utilizó la corrección de Huynh-Feldt. En todos los casos, la significación estadística se consideró a partir de un nivel de significación $P < 0.05$.

4.2. RESULTADOS ESTUDIO I

Caracterización del perfil cognitivo y de conducta exploratoria y temerosidad en situaciones de novedad, en animales 3xTgAD de 2.5 y 6 meses de edad

4.1.1. Aprendizaje y memoria espacial en el MWM

4.1.1.2. 2.5 meses de edad

En la Figura 4.8.A se muestran los resultados de la velocidad media de natación de los dos genotipos, NTg vs. 3xTgAD, a los 2.5 meses de edad. El grupo 3xTgAD presenta una mayor velocidad de natación que el grupo NTg ($t_{1,24}=2.75$, $P<0.05$). Debido a esta diferencia entre genotipos, la ejecución de los animales en el test será evaluada a partir de la “distancia recorrida” en lugar de las “latencias de llegada a la plataforma”.

En la Figura 4.8.B se ilustran los resultados de la tarea de aprendizaje espacial de referencia (“*Place task*”) de los grupos NTg y 3xTgAD de 2.5 meses de edad. Podemos observar que los dos genotipos desarrollan curvas de aprendizaje (MANOVA, efecto “día”: $F_{3,72}=23.57$, $P<0.001$) que son globalmente similares (efecto “genotipo”: $F_{1,24}=1.51$, *n.s.*), con una evolución a lo largo de los días semejante (efecto interacción “genotipo x día”: $F_{3,72}=0.89$, *n.s.*).

En el test de memoria sin plataforma, llevado a cabo 1h 30min después de finalizar la tarea de aprendizaje espacial de referencia (“*removal*”, RM1h30; Fig. 4.8.C), los resultados de la prueba T-Student muestran que ya a los 2.5 meses de edad existe una ligera diferencia en retención de la memoria entre los ratones 3xTgAD y los NTg. Así lo indica el hecho de que los animales 3xTgAD realizan un número menor de a.c. (n° de cruces por el anillo donde se

hallaba la plataforma en la PT) que el grupo NTg. En cuanto al porcentaje de distancia recorrida en P (cuadrante donde se encontraba la plataforma) respecto a la distancia total, y la distancia recorrida hasta realizar el primer cruce del anillo, no se observan diferencias entre ambos genotipos (ver significaciones estadísticas en la tabla de la Figura 4.8.C).

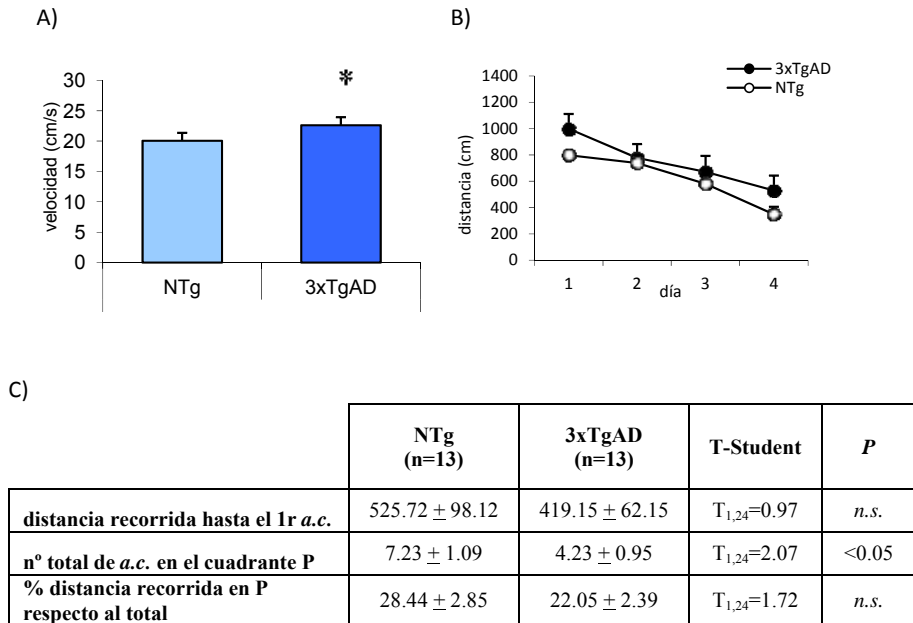


Figura 4.8.- Se representan medias \pm error estándar. **A)** Diferencia en la velocidad media de natación entre genotipos ($n=13$ por grupo) a los 2.5 meses de edad, en el MWM. La velocidad se calculó a partir de los ensayos de la tarea de "Place task". * $P<0.02$, entre ambos grupos (t de Student). **B)** Tarea de aprendizaje espacial de referencia ("Place task"): Curva de distancias recorridas en el Laberinto acuático de Morris por los grupos NTg y 3xTgAD a los 2.5 meses de edad ($n=13$ por grupo). **C)** Sesión de memoria sin plataforma a las 1h30, en el MWM, de machos de 2.5 meses de edad. Los resultados se representan como media \pm error estándar. Abreviaturas: "a.c.": número de cruces del anillo donde se encontraba la plataforma en la tarea anterior, "P": cuadrante donde se encontraba la plataforma en la anterior tarea de "Place task". Los resultados de la prueba T-Student así como la significación estadística se encuentran representados en la tabla.

4.2.1.3. 6 meses de edad

La Figura 4.9. muestra los resultados de velocidad media de natación entre los grupos NTg y 3xTgAD. Los resultados indican que el grupo 3xTgAD muestra una velocidad media de natación mayor que el grupo NTg ($t_{1,28}=6.61, P<0,001$).

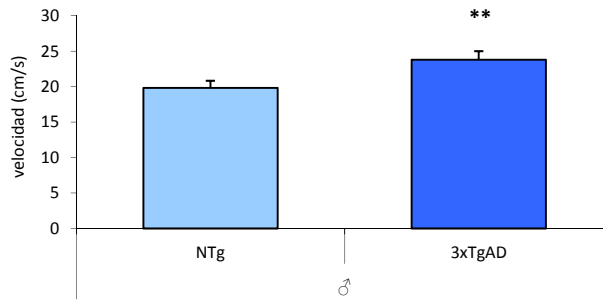
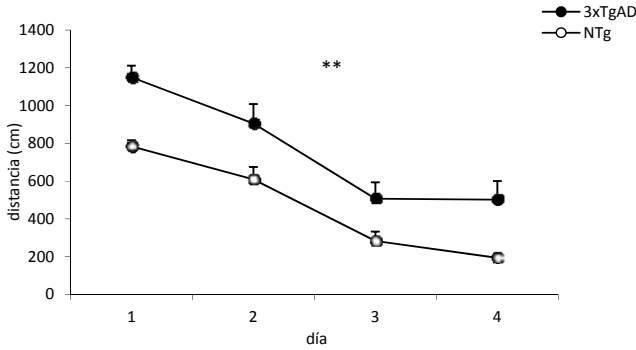


Figura 4.9.- *Diferencia en la velocidad media de natación entre genotipos a los 6 meses de edad en el Laberinto acuático de Morris (NTg: n=13; 3xTgAD: n=17). La velocidad se calculó a partir de los ensayos de la tarea de aprendizaje espacial de referencia. ** $P<0.001$, entre ambos grupos (t de Student). Se representan las medias \pm error estándar.*

En la Figura 4.10. se ilustran los resultados de la tarea de aprendizaje espacial de referencia de los grupos NTg y 3xTgAD evaluados a los 6 meses de edad. En esta tarea podemos observar que ambos genotipos muestran aprendizaje a lo largo de los días (MANOVA, efecto "día": $F_{3,84}=41.22, P<0.001$; Fig. 4.10.A), con un patrón de adquisición similar (interacción "genotipo x día": $F_{3,84}=0.39, n.s.$) pero menos eficiente globalmente en el caso de los 3xTgAD (efecto "genotipo": $F_{1,28}= 24.25, P<0.001$).

A)



B)

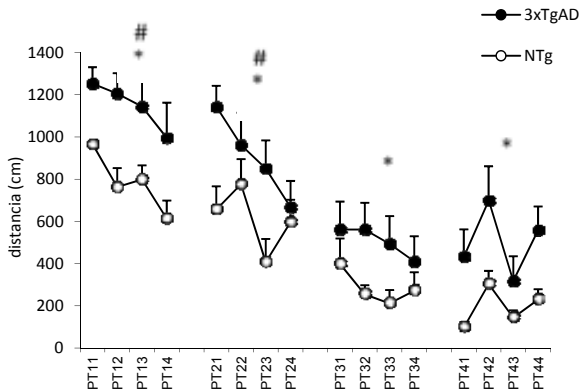


Figura 4.10.- Se representan medias \pm error estándar (NTg: n=13; 3xTgAD: n=17). **A)** Tarea de aprendizaje espacial de referencia (“Place task”): Curva de distancias medias diarias recorridas en el laberinto acuático de Morris por los grupos NTg y 3xTgAD a los 6 meses de edad. **B)** Curva de distancias recorridas ensayo por ensayo en el laberinto acuático de Morris por los grupos NTg y 3xTgAD a los 6 meses de edad. ** $P < 0.001$, * $P < 0.05$ efecto genotipo, # $P < 0.05$ efecto “ensayo”. PT11: “Place task” día 1, ensayo 1; PT12: “Place task” día 1, ensayo 2; PT13: “Place task” día 1, ensayo 3; PT14: “Place task” día 1, ensayo 4; PT21: “Place task” día 2, ensayo 1; PT22: “Place task” día 2, ensayo 2; y así sucesivamente.

Cuando se analizan los datos por ensayos individuales, día por día independientemente, se observa un aprendizaje entre ensayos consecutivos en los días 1 y 2 (MANOVA, efecto "ensayo": día 1, $F_{3,84}=3.16$; día 2, $F_{3,84}=4.58$; $P<0.05$ en ambos casos; Fig. 4.10.B), así como distancias similares durante los cuatro ensayos del día 3 (efecto "ensayo": $F_{3,84}=0.88$, *n.s.*) y diferencias según el ensayo en el día 4 (efecto "ensayo": $F_{3,84}=5.01$, $P<0.05$). No se observa efecto de interacción "ensayo x genotipo" en ninguno de los días (todas las $F_{3,84} \leq 0.73$, *n.s.*) pero sí un efecto "genotipo" durante los días 1 ($F_{1,28}=26.78$, $P<0.001$), día 2 ($F_{1,28}=5.85$, $P<0.05$), día 3 ($F_{1,28}=5.03$, $P<0.05$) y día 4 ($F_{1,28}=9.18$, $P<0.01$), en el sentido de que los ratones 3xTgAD recorren mayores distancias que los controles NTg (Fig. 4.10.B).

En la siguiente Tabla 4.2. se representa el ensayo sin plataforma ("removal" o "probe test") o test de retención/consolidación, realizado 1:30 h y 24h después de la adquisición. Tal y como observamos en la Tabla 4.2, los machos 3xTgAD de 6 meses de edad presentan déficits de retención a corto plazo (1:30 h), pues realizan menor "número de a.c.", y recorren un menor "porcentaje de distancia en el cuadrante donde se encontraba la plataforma en la tarea anterior respecto al total", así como menores "distancias recorridas hasta realizar el primer cruce del anillo" (ver significaciones estadísticas en la Tabla 4.2, "Removal 1h30"). Mientras que, por el contrario, todavía no muestran indicios de déficits de memoria a largo plazo, tal y como observamos en el test del "Removal 24h", donde no encontramos diferencias estadísticamente significativas para ninguna de las variables comentadas (ver Tabla 4.2 "Removal 24h").

Removal 1h30	NTg (n=13)	3xTgAD (n=17)	T-Student	P
distancia recorrida hasta el 1r a.c.	649.29 ± 61.66	554.13 ± 34.42	T _{1,27} =1.41	<i>n.s.</i>
n° total de a.c. en el cuadrante P	9.00 ± 1.18	5.59 ± 0.84	T _{1,28} =2.42	<0.05
% distancia recorrida en P respecto al total	42.26 ± 3.03	28.21 ± 1.35	T _{1,28} =4.60	<0.001

Removal 24h	NTg (n=13)	3xTgAD (n=17)	T-Student	P
distancia recorrida hasta el 1r a.c.	581.19 ± 60.22	609.14 ± 60.87	T _{1,28} =0.32	<i>n.s.</i>
n° total de a.c. en el cuadrante P	7.62 ± 1.23	6.82 ± 1.04	T _{1,28} =0.49	<i>n.s.</i>
% distancia recorrida en P respecto al total	35.87 ± 2.87	28.71 ± 2.32	T _{1,28} =1.96	0.06

Tabla 4.2.- Prueba de memoria sin plataforma (removal) en el Laberinto acuático de Morris, de machos de 6 meses de edad (NTg: n=13; 3xTgAD: n=17). Los resultados se representan como medias ± error estándar. Abreviaturas: "a.c.": número de cruces del anillo donde se encontraba la plataforma en la tarea anterior ("annulus crossing"), "P": cuadrante donde se encontraba la plataforma en la anterior tarea de "Place task". Los resultados de la prueba T-Student así como la significación estadística se encuentran representados en la tabla.

4.2.2. Caracterización de la conducta exploratoria en situaciones de novedad utilizadas como medidas de temerosidad

4.2.2.1. 2.5 meses de edad

Conducta en el test del Campo abierto

En la Figura 4.11. se representan los resultados conductuales en el test de Campo abierto para los dos genotipos. Por lo que respecta a la deambulación, o número de cruces (Fig. 4.11.A-B), aunque parece haber una tendencia a una menor actividad (en los 2 primeros minutos) en los ratones 3xTgAD respecto a los NTg, no hay diferencias estadísticamente significativas, ya sea considerando los cruces por minuto (MANOVA efecto “genotipo”, $F_{1,24}=1.23$, *n.s.*, Fig. 4.11.A) o los totales en los 5 minutos del test ($t_{1,24}=1.23$, $P>0.1$; Fig. 4.11.B).

La Figura 4.11.C muestra una notable reducción del comportamiento exploratorio vertical (“levantamientos” o “*rearings*”), especialmente durante los primeros 3-4 minutos del test, en los animales 3xTgAD (MANOVA, efecto “genotipo”, $F_{1,24}=17.93$, $P<0.001$; y efecto “minuto”, $F_{4,96}=4.26$, $P=0.003$; Fig. 4.11.C). Hay una diferencia significativa en el nivel de actividad vertical total entre los dos genotipos (Fig. 4.11.D, $t_{1,24}=9.62$, $P=0.005$), siendo mucho mayor en los ratones NTg.

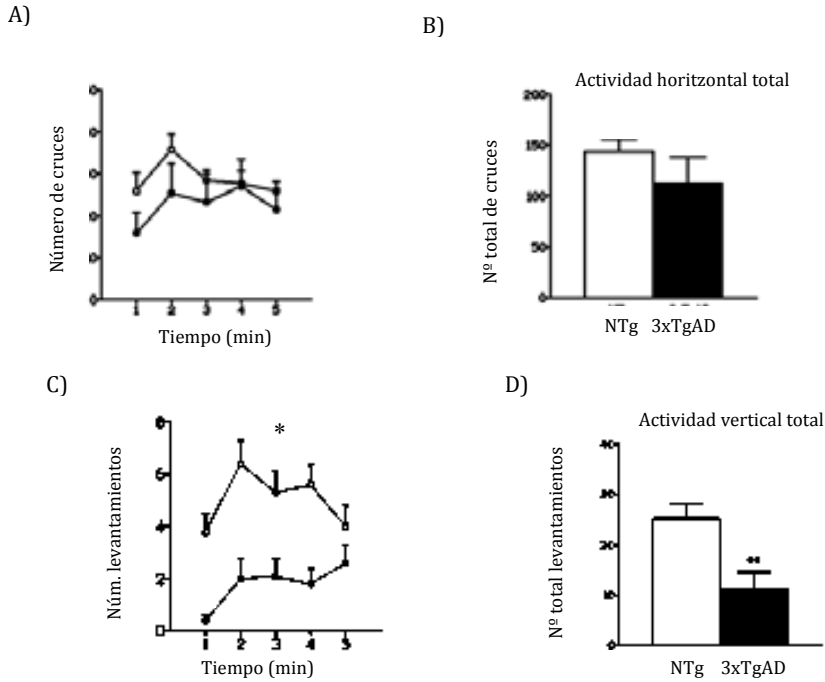


Figura 4.11.- Evaluación conductual de los ratones 3xTgAD en el Campo abierto a los 2.5 meses de edad (n=13 por grupo). Se representa media + error estándar. **A y B)** Actividad locomotora horizontal. **C y D)** Actividad locomotora vertical. NTg: círculos y barras blancas vs. 3xTgAD: círculos y barras negras. * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$, T de Student.

La reducción en la conducta exploratoria en el grupo de los 3xTgAD va asociada a un aumento del número de defecaciones, sugiriendo mayor emotividad/temerosidad del grupo 3xTgAD respecto al NTg (NTg: 1.5 ± 0.5 ; 3xTgAD: 3.8 ± 0.7 ; $t_{1,24}=2.67$, $P < 0.05$).

Conducta en el Laberinto en cruz elevado

La Figura 4.12. pone de manifiesto que no se han encontrado diferencias de ansiedad/temerosidad entre los genotipos en el test del Laberinto en cruz elevado a los 2.5 meses de edad. El “número total de entradas” que hacen los

animales en los brazos abiertos y el “porcentaje de tiempo” que pasan en ellos no muestra diferencias entre ratones 3xTgAD y NTg (ambas $t_{1,24} \leq 0.88$, $P \geq 0.26$). Tampoco se han encontrado diferencias entre los genotipos en el número de defecaciones (media \pm error estándar, NTg: 1.5 ± 0.5 ; 3xTgAD: 2.7 ± 0.6 , $t_{1,24} = 1.63$, *n.s.*).

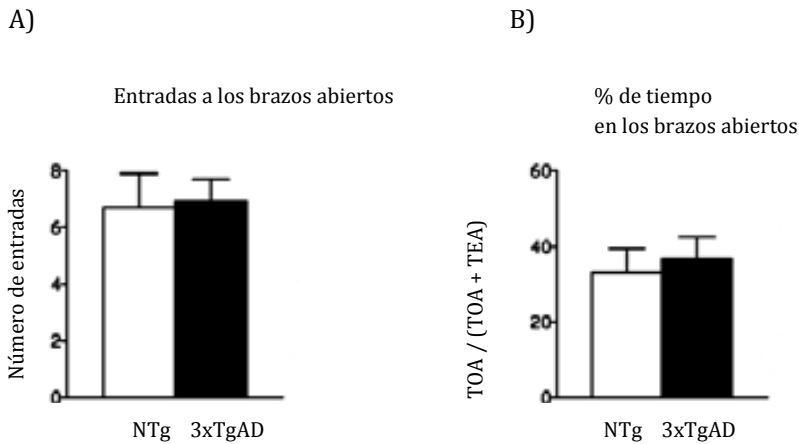


Figura 4.12.- Evaluación conductual de los ratones 3xTgAD a los 2.5 meses de edad en el Laberinto elevado en cruz (grupo NTg $n=13$; grupo 3xTgAD $n=13$). Los resultados se representan como medias \pm error estándar. **A)** Número de entradas totales y **B)** Porcentaje de tiempo transcurrido en los brazos abiertos.

Conducta en la “Tabla de 16 agujeros de Boissier”

Los resultados en las principales variables de este test de conducta exploratoria se representan en la Figura 4.13.A-D.

Los dos genotipos no difieren en ninguna de las variables medidas, presentando los 3xTgAD y NTg idéntico valor de “latencia” (tiempo hasta explorar el primer agujero; Fig. 4.13.A), de “tiempo de exploración” de los agujeros (*head-dipping*) (Fig. 4.13.B) y de “número de exploraciones” de los mismos, así como de repeticiones “A-B-A” (todas las $t_{1,24} \leq 0.92$, $P \geq 0.36$; Fig.

4.13.A-D). Tampoco se observan diferencias significativas entre genotipos por lo que hace referencia al número de defecaciones (media \pm error estándar, NTg: 0.5 ± 0.3 ; 3xTgAD: 1.8 ± 0.6 , $t_{1,24}=2.06$, $P=0.055$), aunque se observa una tendencia de los 3xTgAD a defecar más que el grupo control.

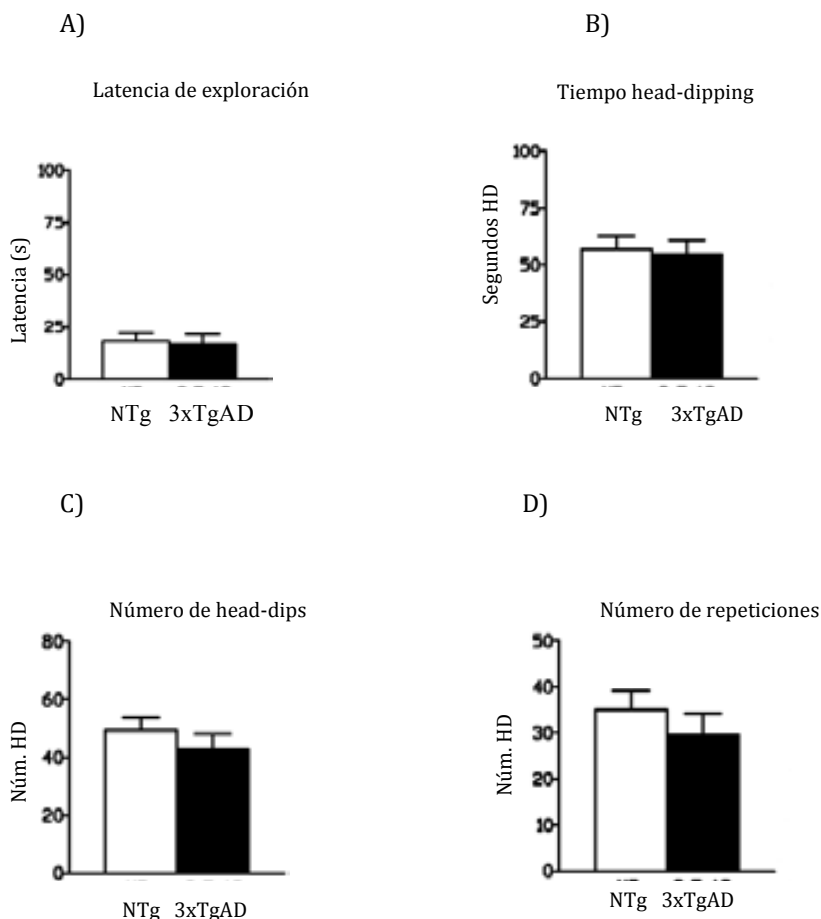


Figura 4.13.- Evaluación conductual de los ratones 3xTgAD en la Tabla de 16 agujeros de Boissier, a los 2.5 meses de edad ($n=13$ por grupo). Los resultados se expresan como medias \pm errores estándar. **A)** Latencia de exploración del primer agujero. **B)** Tiempo (s) de exploración durante toda la sesión. **C)** Número de veces que el animal introduce la cabeza en un agujero (HD) a lo largo de la sesión. **D)** Número de repeticiones de agujeros ya explorados. NTg, barras blancas; 3xTgAD, barras negras.

Conducta en la Caja blanca-y-negra

La Figura 4.14. muestra que no existen diferencias estadísticamente significativas entre genotipos en las dos variables de ansiedad medidas (“latencia de entrada” y “tiempo” en el compartimento blanco; ambas $t_{1,24} \leq 1.22$, $P \geq 0.33$). En cambio, sí que se dan diferencias entre genotipos por lo que respecta al número de defecaciones (media \pm error estándar, NTg: 0.9 ± 0.4 , 3xTgAD: 2.5 ± 0.5 , $t_{1,24} = 2.44$, $P < 0.05$), sugiriendo de nuevo mayor temerosidad en los ratones 3xTgAD.

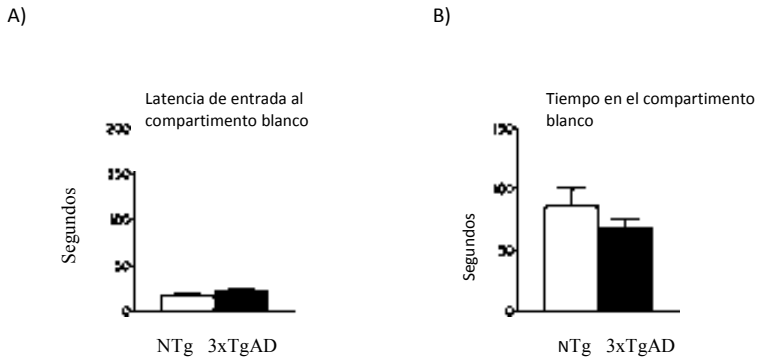


Figura 4.14.- *Evaluación conductual de los ratones 3xTgAD en la Caja blanca-y-negra a los 2.5 meses de edad (n=13 por grupo). Los resultados se expresan como medias \pm errores estándar. **A)** Latencia (s) de los animales en entrar al compartimento blanco. **B)** Tiempo (s) transcurrido en el compartimento blanco.*

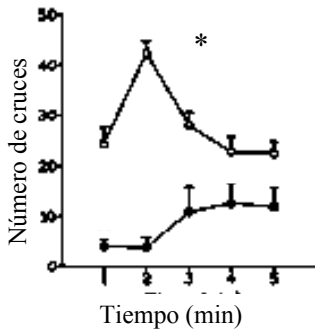
4.2.2.2. 6 meses de edad

Conducta en el test del Campo abierto

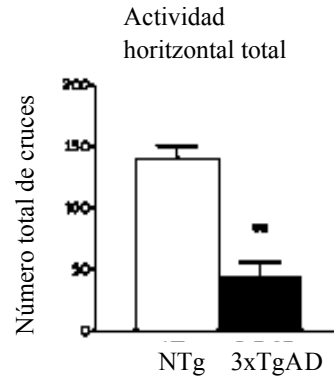
La Figura 4.15.A-D muestra las diferencias en actividad exploratoria que presentan los dos genotipos a los 6 meses de edad en el test de Campo abierto. Analizando la actividad horizontal y vertical minuto a minuto se observa claramente que los ratones 3xTgAD presentan valores muy inferiores a los NTg (ambos MANOVA, “genotipo”, $F_{1,28} \geq 13.53$, $P \leq 0.001$; Fig. 4.15.A y C). Es evidente, también, que tal decremento de conductas exploratorias en los animales transgénicos es mucho más claro en los primeros minutos del test (MANOVA, efecto “minuto”, ambas $F_{3,84} \geq 3.88$, $P < 0.05$; efecto “genotipo x minuto”, ambas $F_{3,84} \geq 11.70$, $P < 0.001$).

Lo anterior da lugar a totales de actividad locomotora horizontal (Fig. 4.15.B) y vertical (Fig. 4.15.D) significativamente inferiores en los ratones 3xTgAD (ambas $t_{1,28} \geq 3.64$, $P \leq 0.01$). Además de esta reducción de la conducta locomotora y de la exploración vertical, los animales 3xTgAD presentan aparentemente un mayor nivel de temerosidad respecto al grupo de los NTg, como representaría la diferencia en número de defecaciones (media \pm error estándar, NTg: 2.0 ± 0.5 , 3xTgAD: 3.8 ± 0.5 , $t_{1,28} = 2.35$, $P < 0.05$).

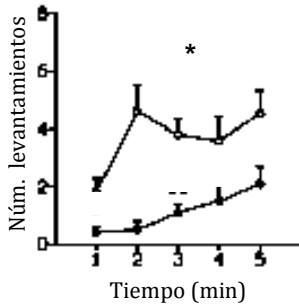
A)



B)



C)



D)

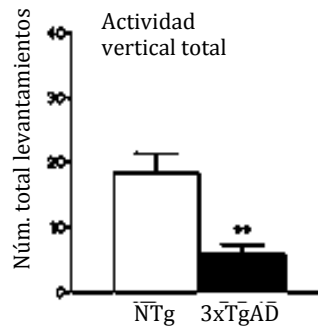


Figura 4.15.- Evaluación conductual de los ratones 3xTgAD en el Campo abierto a los 6 meses de edad (NTg: $n=13$; 3xTgAD: $n=17$). Los resultados expresados como media \pm error estándar. **A y B)** Actividad locomotora horizontal. **C y D)** Actividad locomotora vertical. NTg: círculos y barras blancas vs. 3xTgAD: círculos y barras negras. * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$, T de Student.

Conducta en Laberinto en cruz elevado

La Figura 4.16. muestra que los dos genotipos no presentan diferencias de ansiedad/temerosidad en este test. El “número de entradas total” que realizan los animales a los brazos abiertos, y el “porcentaje de tiempo” que pasan allí no difiere entre los grupos 3xTgAD y NTg (ambas $t_{1,28} \leq 0.56$, *n.s.*). En cambio, se han encontrado diferencias entre los genotipos en el número de defecaciones, que, al igual que ocurría en el test de Campo abierto, es más elevado en los ratones 3xTgAD (media \pm error estándar, NTg: 0.9 ± 0.3 ; 3xTgAD: 2.7 ± 0.4 , $t_{1,28}=3.26$, $P<0.005$).

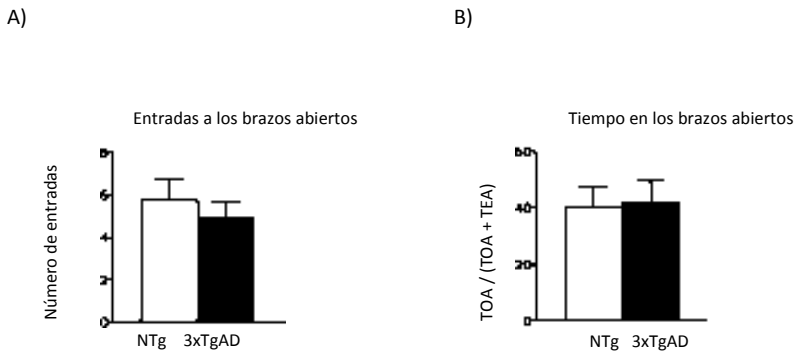


Figura 4.16.- Evaluación conductual de los ratones 3xTgAD a los 6 meses de edad en el Laberinto en cruz elevado (grupo NTg $n=13$, grupo 3xTgAD $n=17$). Los resultados se representan como medias \pm error estándar. **A)** Número de entradas total y **B)** Porcentaje de tiempo transcurrido en los brazos abiertos.

Conducta en la “Tabla de 16 agujeros de Boissier”

Los dos genotipos no difieren en ninguna de las variables medidas (todas las $t_{1,28} \leq 1.54$, $P \geq 0.14$), como se observa en la Figura 4.17.A-D. Por tanto, en este test los 3xTgAD y NTg presentan las mismas características a nivel de actividad exploratoria. Sí que aparecen, de nuevo, diferencias entre genotipos en el número de defecaciones, que es mayor en el grupo de los 3xTgAD (media \pm error estándar, NTg: 0.8 ± 0.4 ; 3xTgAD: 2.6 ± 0.5 , $t_{1,28} = 2.74$, $P < 0.05$).

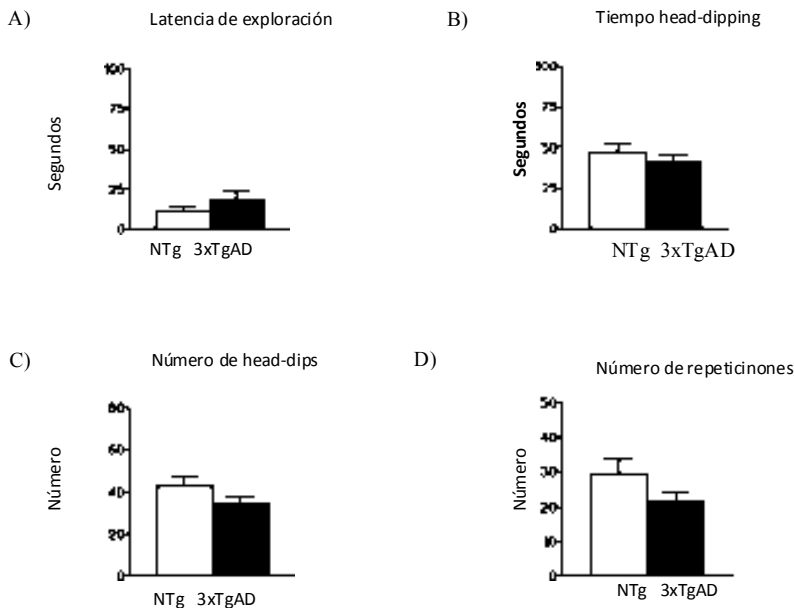


Figura 4.17.- Evaluación conductual de los ratones 3xTgAD en la Tabla de 16 agujeros de Boissier, a los 6 meses de edad (NTg: $n=13$; 3xTgAD: $n=17$). Los resultados se expresan como medias \pm errores estándar. **A)** Latencia de exploración del primer agujero. **B)** Tiempo (s) de exploración (head dipping) durante toda la sesión. **C)** Número de veces que el animal introduce la cabeza en un agujero (head-dips) a lo largo de la sesión. **D)** Número de repeticiones de exploración de agujeros ya explorados.

Conducta en la Caja blanca-y-negra

A los 6 meses de edad no se observan diferencias entre los dos genotipos por lo que respecta a la latencia de entrada al compartimento blanco, como muestra la Figura 4.18A ($t_{1,28}=0.77$, *n.s.*). En cambio, como se indica en la Figura 4.18.B, el grupo de los 3xTgAD pasa más tiempo en el compartimento blanco que los ratones NTg ($t_{1,28}=2.49$, $P<0.05$). También se encuentran diferencias entre los dos genotipos por lo que respecta al número de defecaciones, que es mayor en el grupo de 3xTgAD (media \pm error estándar, NTg: 1.1 ± 0.4 ; 3xTgAD: 3.0 ± 0.6 , $t_{1,28}=2.86$, $P<0.01$).

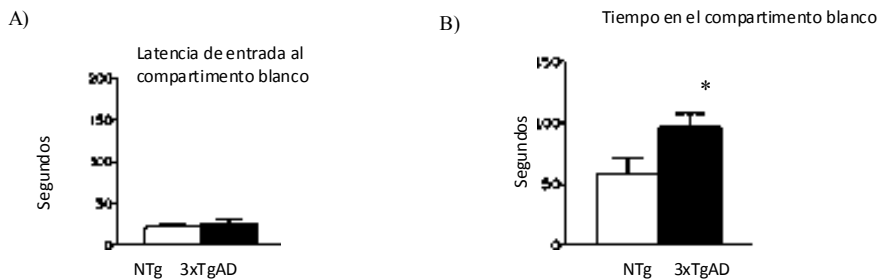


Figura 4.18.- Evaluación conductual de los ratones 3xTgAD en la Caja blanca-y-negra a los 6 meses de edad (NTg: $n=13$; 3xTgAD: $n=17$). Los resultados se expresan como medias \pm errores estándar. **A)** Latencia (s) de los animales en entrar al compartimento blanco de la caja. **B)** Tiempo (s) transcurrido en el compartimento blanco, * $P<0.05$, T de Student.

4.3. DISCUSIÓN ESTUDIO I

De manera resumida, los resultados del Estudio I muestran que, a los 2.5 meses de edad, cuando apenas se ha iniciado el proceso de acumulación de β A intraneuronal en la corteza (Oddo *et al.*, 2003b), los ratones 3xTgAD presentan sutiles déficits de memoria (en la tarea del *Removal 1h30*), acompañados de una ligera alteración a nivel no cognitivo (BPSD), que se refleja en la disminución de los niveles de actividad exploratoria vertical en el OF. Dicha alteración de la actividad exploratoria es, probablemente, resultado de un aumento en los niveles de temerosidad tal como sugieren las defecaciones en las pruebas del OF y la DLB.

Las alteraciones a nivel cognitivo y emotivo (BPSD) que muestran los ratones 3xTgAD de 2.5 meses se ven incrementadas a los 6 meses de edad, cuando la acumulación intraneuronal de β A se extiende hacia el hipocampo y se inicia la deposición extracelular de β A de manera difusa en la corteza (Oddo *et al.*, 2003b). De modo que los animales 3xTgAD de 6 meses muestran déficits de aprendizaje y memoria de referencia, acompañados de niveles de temerosidad incrementados y una cierta desinhibición en la DLB. A continuación discutiremos más detalladamente dichos resultados.

4.3.1. Caracterización del perfil cognitivo de aprendizaje y memoria en ratones 3xTgAD de 2.5 y 6 meses de edad

Tal y como muestran los datos ilustrados en el apartado 4.2.1. (en “resultados del Estudio I”), la prueba del Laberinto acuático de Morris, utilizada para la evaluación de las funciones cognitivas de los animales, indica que los ratones 3xTgAD de 2.5 meses de edad, a pesar de encontrarse en un estadio pre-

patológico de la enfermedad, ya muestran una leve alteración en el perfil cognitivo.

Oddo *et al.* (2003a) mostraron que a los 2 meses de edad, los ratones 3xTgAD no presentaban todavía ninguna manifestación de la patología β A o Tau en ninguna región cerebral, mientras que a los 3 meses se observaba por primera vez inmunoreactividad a la β A intraneuronal, localizándose únicamente en la corteza (Oddo *et al.*, 2003b). Posteriormente, los trabajos de Billings *et al.* (2005) realizados con este mismo modelo animal, y en consonancia con los resultados obtenidos por Oddo *et al.* (2003a), indicaron que los ratones triple transgénicos de 2 meses tampoco mostraban alteraciones en la tarea de aprendizaje y memoria espacial en el Laberinto acuático de Morris, además de no presentar diferencias de memoria respecto al grupo control en experimentos de condicionamiento de miedo a un contexto espacial. De este modo, se pudo concluir que a los 2 meses de edad el perfil cognitivo de los animales 3xTgAD todavía no mostraba alteraciones y, por tanto, el aprendizaje y memoria ligados a tareas dependientes de la corteza, el hipocampo y la amígdala (áreas diana en la enfermedad de Alzheimer), eran normales.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, con animales de 2.5 meses de vida muestran, en concordancia con los datos obtenidos en estudios de Billings *et al.* (2005) y Oddo *et al.* (2003a-b) en ratones de 2 y 3 meses de edad, que el grupo 3xTgAD no presenta alteraciones en la tarea de aprendizaje espacial de referencia en el Laberinto acuático de Morris (Fig. 4.8.A), tarea que requiere memoria a corto plazo (entre los 15 minutos entre ensayos de un mismo día) y a largo plazo (entre días). Sin embargo, en la sesión de memoria sin plataforma a la 1h30 (Fig. 4.8.C), vemos que los ratones 3xTgAD muestran una ligera alteración respecto a los NTg, traducida en un menor número de cruces del anillo donde se hallaba la plataforma durante la adquisición o entrenamiento (*annulus crossings, a.c.*). Tal y como se indica en la Fig. 4.8.C, esa es la única diferencia estadísticamente significativa entre grupos. Estos datos indican que

posiblemente a esta edad ya podría existir una leve alteración de la memoria espacial, a pesar de la ausencia de placas de βA (su inicio de ha descrito a los 6 meses de vida por Billings *et al.*, 2005) y de que la presencia inicial de βA intraneuronal no haya sido descrita hasta los 3 meses de edad en el modelo 3xTgAD (Oddo *et al.*, 2003b). Por tanto, estos resultados no replican exactamente los obtenidos por Billings *et al.* (2005) en estas mismas tareas del MWM, en los que se describía la ausencia de déficits cognitivos de aprendizaje y memoria espacial en animales 3xTgAD de 2 meses de edad, ya que en nuestro estudio se trata de animales de 2.5 meses de edad, una diferencia que marca el inicio de la patología. Sin embargo, las alteraciones de memoria observadas en los ratones 3xTgAD de 2.5 meses podemos decir que son muy leves, ya que únicamente son detectadas en la prueba de memoria sin plataforma de 1h30 (*Removal 1h30*). Además, aunque las diversas variables estudiadas nos muestran la tendencia de los animales 3xTgAD a realizar una peor ejecución de la tarea en el *Removal 1h30*, solamente el número de *annulus crossings* nos indica que existe una diferencia significativa respecto al grupo control. Esta leve alteración cognitiva a los 2.5 meses de vida podría ser coherente con la descripción de los primeros indicios de acumulación de la βA intraneuronal en la corteza a los 3 meses de edad descritos por Oddo *et al.* (2003b).

De hecho, hasta el inicio del presente estudio, los primeros déficits cognitivos detectados en los ratones 3xTgAD se mostraron a los 4 meses de edad, y únicamente en el proceso de retención a largo plazo en el MWM (Billings *et al.*, 2005). Posteriormente, otros estudios también han demostrado la presencia de déficits cognitivos en los ratones 3xTgAD a los 4 meses, como Cañete (2011), que encuentra alteraciones en el proceso de adquisición y de memoria a corto y largo plazo en el MWM, y García-Mesa *et al.* (2011) que, replicando los resultados de Billings *et al.* (2005), observan déficits en la retención a largo plazo en animales 3xTgAD.

A los 6 meses de edad, la patología de la enfermedad (Oddo *et al.* 2003b) y, en consecuencia, los déficits cognitivos (Billings *et al.*, 2005), han ido progresando. Así como a los 2.5 meses de vida de los ratones 3xTgAD observábamos una leve alteración cognitiva, a los 6 meses de edad los animales 3xTgAD muestran claramente déficits cognitivos de aprendizaje y memoria característicos de la evolución de la enfermedad. Las curvas de adquisición en el MWM presentan diferencias cuando se analizan tanto las distancias medias diarias (Fig. 4.10.A), como cuando se tienen en cuenta los 4 ensayos diarios individualmente (Fig. 4.10.B), indicando que los ratones 3xTgAD realizan una peor ejecución de la tarea de aprendizaje espacial de referencia respecto a los NTg, y señalando un déficit de aprendizaje/memoria en el grupo 3xTgAD. Asimismo, también encontramos déficits evidentes en la Prueba de memoria sin plataforma (RM 1h30) (Tabla 4.2.), donde los animales 3xTgAD muestran menor “porcentaje de distancia recorrida en P respecto al resto de cuadrantes” y un menor “número de *annulus crossings*”. Además, en la prueba de memoria sin plataforma a las 24h de la *Place task* (RM 24h), se observa una tendencia de los animales 3xTgAD a mostrar déficits de memoria a largo plazo, si bien no llega a la significación estadística ($P=0.06$; ver Tabla 4.2.).

Los déficits de aprendizaje y memoria de los ratones 3xTgAD observados en el paradigma de la *Place task*, así como los indicios de déficits de memoria en la tarea de RM 1h30 y la tendencia observada en la prueba de memoria a largo plazo (RM 24h), van en la misma dirección que los resultados obtenidos por Billings *et al.* (2005). Las diferencias de aprendizaje y memoria, observadas a los 6 meses de vida de los animales, coinciden con la edad en la que ya se ha descrito la presencia β A intraneuronal en la corteza y el hipocampo y se inicia la deposición extracelular del péptido amiloide en la neocorteza (Billings *et al.*, 2005). Además, a esta edad, se describe una disminución de los receptores α 7nACh y disfunción sináptica con déficits profundos de LTP (Oddo *et al.*, 2003a-b). Esta última es una forma de plasticidad sináptica que se considera una de las bases del aprendizaje y la memoria (Bliss y Collingridge, 1993).

Estos resultados sugieren, de manera consistente que, la β A intracelular puede tener un papel relevante en la aparición del declive cognitivo característico de la enfermedad de Alzheimer, y en ausencia de alteraciones estructurales de tipo patológico (placas u ovillos), las cuales deben contribuir a la disfunción cognitiva en estadios más avanzados de la enfermedad. De hecho, existen diversos modelos animales que refuerzan la hipótesis de la β A intraneuronal como desencadenante de las alteraciones cognitivas. Estos modelos de transgénicos, que sobre-expresan diversas mutaciones de APP o bien la APP humana *wild-type* en el cerebro, presentan cambios fenotípicos tempranos a nivel cognitivo que surgen antes de que se haya iniciado la neuropatología, y correlacionan de manera pobre con el número de placas, reforzando así la hipótesis “amiloide intraneuronal”. Este es el caso de los ratones TgAPP/Ld/2 y TgAPP/Wt/4, los cuales presentan déficits cognitivos mucho antes de la formación de placas, correlacionando con una reducida LTP (Moechars *et al.*, 1999). O los ratones TgPDAPP, en los que los déficits no se relacionan con la deposición de β A sino con la atrofia del hipocampo (Dodart *et al.*, 2000, 2002). El modelo de ratón C57BL/6, que expresa el transgen APP, también muestra un declive cognitivo progresivo en ausencia de deposición visible de placas. Estos estudios demuestran que la expresión del transgen humano APP *wild-type* por sí sólo, ya es suficiente para causar deterioro cognitivo en ausencia de depósitos amiloides detectables (Moechars *et al.*, 1999).

4.3.2. Caracterización del perfil de alteraciones emocionales y conductuales, no esencialmente cognitivo, (BPSD) en ratones 3xTgAD de 2.5 y 6 meses de edad

Diversos modelos animales de AD muestran alteraciones no cognitivas, de alguna forma similares a los trastornos neuropsiquiátricos que presentan los pacientes humanos. Los síntomas psicóticos (delirios, alucinaciones, actividad

motora aberrante) y emocionales (agitación, disforia, ansiedad, irritabilidad, apatía) son BPSD importantes tanto en pacientes con AD suave, como en AD moderado y severo (Shimabukuro *et al.*, 2005). La apatía, la actividad motora aberrante, la disforia y ansiedad, son los síntomas más frecuentes descritos por los cuidadores (ver ej. Piccininni *et al.*, 2005). Con excepción de las alucinaciones, todos los BPSD están presentes desde los estadios leves de la demencia, y los delirios, las alucinaciones y la actividad motora aberrante, presentan una tendencia clara a incrementarse con la severidad de la enfermedad (Piccininni *et al.*, 2005).

A pesar de que la paranoia, las ideas delirantes y las alucinaciones, son características conductuales humanas difíciles de caracterizar en el fenotipado de los modelos animales de AD, otros síntomas como la actividad motora aberrante, la apatía, la agresividad, las alteraciones afectivas y la ansiedad, han sido caracterizados más o menos exitosamente en los modelos animales existentes. Así, diversos modelos animales que expresan la β APP *wild-type* humana, o bien la forma mutada, muestran una disminución en el número de cambios espontáneos que hace el animal en los brazos del “Laberinto en T” (*T-maze*) y “Laberinto en Y” (*Y-maze*) (ambos test basados en la curiosidad natural del animal por explorar nuevos ambientes) que se observa antes de que se inicie la formación de placas (p. ej. a los 3 meses de edad en el modelo β APP₆₉₅SWE; King y Arendash, 2002), y se acentúa con la edad (Arendash *et al.*, 2001; Holcomb *et al.*, 1999; King y Arendash, 2002; Lalonde *et al.*, 2003a). Según Lalonde *et al.* (2002), uno de los motivos de esta alteración podría ser una disminución de la motivación por la exploración. Algunos de estos estudios aportan resultados sobre la hiperactividad de animales β APP₆₉₅SWE envejecidos (Lalonde *et al.*, 2003a), pero también de jóvenes sin presencia de placas (King y Arendash, 2002; King *et al.*, 1999), que excluirían la disminución de la curiosidad como causa de la disminución en el número de cambios de brazo espontáneos que hacen los animales en estos test. En cambio, otros autores han encontrado ausencia de cambios en los niveles de actividad de

aquellos ratones transgénicos testados en edades en que la deposición de placas ya está presente (Chapman *et al.*, 1999, Holcomb *et al.*, 1999).

Por lo que respecta a la caracterización de las conductas BPSD en el modelo de ratón 3xTgAD, los resultados obtenidos en la colonia española que se presentan en este estudio, muestran alteraciones en la actividad exploratoria en el OF y de temerosidad/ansiedad en este test y la Caja blanca-y-negra ya a los 2.5 meses de edad, que se hacen más evidentes a los 6 meses de edad. A los 2.5 meses de edad, el número de levantamientos (*rearings*), que se conoce como una medida representativa de conducta/motivación exploratoria, se ve reducido de forma importante en los ratones 3xTgAD desde los primeros minutos de test y, como consecuencia, también lo está el número de levantamientos total (Fig. 4.11.C-D respectivamente). En estudios posteriores, y en concordancia con los resultados de Cañete (2011) en ratones 3xTgAD de 2 meses de edad, hemos podido observar que los animales 3xTgAD presentan conducta de petrificación (*freezing*) inicial, contribuyendo a la reducción observada en la conducta exploratoria en estos animales. Los datos de actividad locomotora horizontal (*crossings*) no muestran diferencias significativas entre genotipos, si bien los valores de los ratones 3xTgAD también están por debajo de los valores de los animales NTg. Cañete (2011) indica que ambas actividades locomotoras están correlacionadas entre sí, lo que sugiere que la tendencia de disminución de la actividad locomotora horizontal ilustrada en la Figura 4.11.A-B va en paralelo y asociada a la disminución en actividad vertical (Fig. 4.11.C-D). Por otro lado, estos mismos animales muestran una conducta exploratoria normal cuando son evaluados en el test de Boissier (Figura 4.13.A-D) o en un actímetro (resultados de Cañete, 2011), indicando que las alteraciones en el patrón de actividad exploratoria son muy leves a esta edad. Y, tanto en el Campo abierto, como en la DLB y el test de Boissier, el número de defecaciones en el grupo 3xTgAD es superior al de los NTg, sugiriendo mayores niveles de temerosidad/aniedad de los ratones 3xTgAD respecto a los NTg.

En su conjunto, estos datos indican que los ratones 3xTgAD de 2.5 meses de edad ya presentan un cierto nivel de ansiedad/temerosidad detectable en ciertas condiciones experimentales (Campo abierto iluminado y Caja blanca-y-negra). La β A intraneuronal se empieza a detectar a los 3 meses de edad en la corteza, pero podría ser que a los 2.5 meses ya hubiese empezado el proceso de acumulación intracelular del péptido o algún proceso neural alterado y previo, con las consiguientes alteraciones conductuales que serían mínimamente detectables con la batería conductual por el hecho de encontrarnos en los inicios del proceso. En el resto de pruebas, los animales 3xTgAD se comportan de forma similar a los ratones NTg, como sería esperable en este estadio tan temprano.

A los 6 meses de edad la β A intraneuronal se encuentra ampliamente extendida por la corteza, donde se inicia la formación de depósitos difusos del péptido amiloide, y ya se encuentran acumulaciones intraneuronales de β A en el hipocampo (Oddo *et al.*, 2003a-b). Las diferencias conductuales entre los genotipos son más evidentes, tal y como corroboran los datos del presente estudio a nivel cognitivo. Por lo que respecta a los BPSD observables en el modelo de ratón 3xTgAD, la reducción de la actividad exploratoria que encontrábamos en el OF a los 2.5 meses de edad, también está presente en los animales de 6 meses (Fig. 4.15.), aunque las diferencias son mucho más pronunciadas y afectan de forma drástica, ahora sí, tanto a la conducta exploratoria horizontal (*crossings*, Fig 4.15.A-B) como a la vertical (*rearings*, Fig. 4.15.C-D). De hecho, Cañete (2011) también encuentra una reducción en los niveles de actividad exploratoria en animales 3xTgAD de 4 meses, sugiriendo que la acumulación intraneuronal de β A en el hipocampo y la corteza también produce cambios en los niveles de actividad exploratoria de los animales transgénicos.

Los niveles de ansiedad/temerosidad de los ratones 3xTgAD de 6 meses vs. los NTg probablemente se incrementen en un ambiente aversivo como el del

Campo abierto, respecto a los observados a los 2.5 meses de edad, tal vez debido a la afectación límbica por β A intraneuronal descrita a los 6 meses de edad (Billings *et al.* 2005). En línea con lo comentado, España *et al.* (2009) encuentran un incremento en la conducta neofóbica en el Test de las esquinas y en el Test de condicionamiento de miedo al contexto (actividad dependiente de la función del hipocampo y la amígdala), en animales 3xTgAD de 6 meses de edad.

Sin embargo, no se han encontrado diferencias de actividad exploratoria entre genotipos en el test de Boissier (Fig. 4.17.), recordando que nos encontramos en una etapa temprana del desarrollo de la enfermedad. Como veremos en el Estudio II, los datos obtenidos en el test de Boissier, con animales de 12 y 15 meses de edad, nos indican que la tendencia de disminución de actividad exploratoria que observamos a los 6 meses es el augurio de la disminución que se observa en fases avanzadas de la enfermedad.

Las alteraciones conductuales de los animales 3xTgAD son también detectadas en la DLB (Fig. 4.18.). En este caso, van en sentido contrario al esperado, encontrando discordancias con los resultados de España *et al.* (2009) donde los ratones 3xTgAD de 6 meses presentan, de nuevo, mayores niveles de ansiedad/temerosidad respecto a los NTg. Así, nuestros resultados muestran que son los animales 3xTgAD el grupo que pasa más tiempo en el compartimento blanco de la caja, el que produce más aversión a los roedores (Fig. 4.18.B). Este hecho, similar a algunos resultados de Cañete (2011), podría ser debido a que en un ambiente aversivo como es el OF blanco, abierto e iluminado, donde los animales son depositados en el centro del aparato, (sintiéndose desprotegidos), los ratones 3xTgAD muestran ansiedad haciendo conducta de petrificación (*freezing*); mientras que en la DLB los animales inician el test en la zona negra y oscura, la cual ofrece un cierto nivel de protección, y de este modo permite que la conducta de los animales 3xTgAD se muestre de manera diferente, como un incremento de la conducta de

desinhibición en el compartimento blanco iluminado con luz roja tenue. En cualquier caso, en los cuatro test de la batería conductual, el número de defecaciones es mayor para el grupo 3xTgAD, lo que indicaría mayores niveles de temerosidad/ansiedad que el grupo NTg.

Otros modelos de AD, como son los ratones β APP₆₉₅SWE y PS1/A246, también muestran conducta de desinhibición en el PM, con un mayor número de entradas en los brazos abierto y más tiempo transcurrido en éstos (Lalonde *et al.*, 2003a-b). En el caso del modelo 3xTgAD, la conducta de desinhibición que presentan los animales 3xTgAD, sólo la vemos en el test de la DLB. La configuración negra de todos los brazos del Laberinto en cruz elevado podría ser responsable de la ausencia de diferencias entre genotipos, y a pesar de que se sabe que este test fue validado para detectar los efectos ansiolíticos inducidos farmacológicamente, se ha mostrado más limitado para evaluar diferencias en el perfil ansioso de algunos animales modificados genéticamente (p. ej. Giménez-Llort *et al.*, 2002) o incluso seleccionados psicogenéticamente para esta característica (p. ej. Fernández-Teruel *et al.*, 2002).

La conducta ansiosa también ha sido estudiada en otros modelos animales transgénicos que expresan la proteína humana *wild-type* (β APP₇₅₁, Moran *et al.*, 1995), la misma mutación (β APP₇₅₁SWE, Lalonde *et al.*, 2002), y en dobles transgénicos (β APP₆₉₅SWE i PS1M146L, Arendash *et al.*, 2001), mostrando que o bien no hay diferencias con los respectivos controles o que en algunos casos la ansiedad podría estar incrementada (β APP₆₉₅SWE/humo+PS1/A246E). Otros modelos de ratones transgénicos, como los Tg-APP(Sw,V717F)/B6, muestran déficits progresivos de aprendizaje y memoria, y niveles de ansiedad elevados en edades con ausencia de deposición visible de placas.

4.3.3. Recapitulación sobre el Estudio I

Modelar los síntomas conductuales (fundamentalmente cognitivos) y neuronales del AD en ratones ha sido un desafío, y muchos de los modelos animales existentes tienen un valor predictivo pobre debido a que únicamente se basan en una de las dos patologías (principalmente en las placas de β A). La tecnología de transferencia génica ha supuesto un gran avance en el modelado de la sintomatología característica de esta enfermedad, a pesar de que todavía hoy algunos fenotipos como la disfunción o la pérdida sináptica, así como algunas conductas particulares de los humanos, son escasamente mimetizadas, siendo difícil establecer un paralelismo. Este es el caso de los síntomas neuropsiquiátricos (*Behavioural and Psychological Symptoms of Dementia*, BPSD), cuyo estudio apenas se ha iniciado en estos modelos.

En los ratones 3xTgAD, y de manera paralela a la enfermedad en humanos, la patología amiloide y neurofibrilar está predominantemente confinada a la corteza, el hipocampo y la amígdala, donde aparecen de forma jerárquica y escalonada temporalmente (ver "Introducción"; Billings *et al.*, 2005; Oddo *et al.*, 2003a-b). Estas características neuropatológicas propias de la enfermedad, correlacionan inicialmente con la disfunción sináptica, déficits colinérgicos y cognitivos, mientras que en estadios más avanzados lo hacen con procesos de gliosis reactiva (LaFerla *et al.*, 2005; Oddo *et al.*, 2003a-b; Kitazawa *et al.*, 2005). La presencia de este espectro neuropatológico tan amplio y su paralelismo con el patrón neuroanatómico y temporal que se observa en humanos, confieren al modelo un gran potencial para el estudio de los procesos neuronales subyacentes y las posibles estrategias terapéuticas. El patrón neuroanatómico hace que los perfiles conductuales más afectados en estos ratones sean los de aprendizaje y memoria, mimetizando la demencia característica en los pacientes humanos. En el primer trabajo donde los ratones 3xTgAD se dieron a conocer a la comunidad científica, se describieron ya déficits cognitivos en el Laberinto acuático de Morris a los 6 meses de edad

(Oddo *et al.*, 2003a) cuando solamente se detecta la presencia de β A intraneuronal y las placas extracelulares de β A empiezan a formarse de forma difusa en el corteza, corroborándose después con un estudio longitudinal más amplio, utilizando animales 3xTgAD que fueron evaluados a los 2, 4, 6, 9, 12, 15 y 18 meses de edad en el Laberinto acuático de Morris (MWM), en la evitación inhibitoria (*Inhibitory avoidance*) y en el reconocimiento de nuevos objetos (OR) (Billings *et al.*, 2005). Este trabajo indica que, los primeros déficits cognitivos que se detectaron en animales 3xTgAD fueron a los 4 meses de edad, coincidiendo con la acumulación intraneuronal de β A, y afectaban únicamente a la memoria a largo plazo. Posteriormente, se observó que los déficits cognitivos se extendían a la memoria a corto plazo, sobre los 6 meses de edad de los ratones 3xTgAD (Billings *et al.*, 2005). Así, los datos que mostramos en el presente Estudio I corroboran estos resultados sobre el fenotipado cognitivo obtenido por Billings *et al.* (2005) en edades tempranas donde se observan los estadios pre-patológicos (2.5 meses) e iniciales (6 meses) de la enfermedad, indicando que la colonia española no ha divergido de la colonia madre americana, y amplían la caracterización conductual del modelo con nuevos datos sobre el fenotipo no cognitivo, de tipo neuropsiquiátrico (o BPSD), de la enfermedad.

Así, resumidamente, nuestros resultados muestran por primera vez que, en los ratones 3xTgAD a los 2.5 meses de edad se observa una ligera alteración de la memoria, detectable únicamente en la tarea de la “sesión de memoria sin plataforma” de 1h30 en el Laberinto acuático de Morris. Este sutil déficit cognitivo va acompañado además de una leve diferencia conductual a nivel no cognitivo, como es la reducción de la actividad exploratoria vertical en el Campo abierto, probablemente como resultado de un incremento del nivel de ansiedad/temerosidad respecto a los NTg, como también señala el incremento en número de defecaciones que se da en el Campo abierto y la Caja blanca-y-negra. Por tanto, el estudio de los síntomas BPSD en animales 3xTgAD a esta edad ofrece, por primera vez, evidencia de que a estadios pre-patológicos en

los que todavía no se ha detectado acumulación intraneuronal del péptido amiloide, ya existen alteraciones conductuales en los ratones 3xTgAD.

Los datos obtenidos a los 6 meses de vida, edad en la que se ha descrito la acumulación progresiva de la β A intraneuronal acompañada de déficits sinápticos y colinérgicos, replican aquellos obtenidos por Billings *et al.* (2005) a nivel cognitivo, en la Laberinto acuático de Morris. A nivel no cognitivo, los resultados demuestran que en ratones 3xTgAD se produce un incremento de los niveles de ansiedad/temerosidad y conducta de desinhibición, respecto a los NTg, probablemente como resultado de la afectación de áreas límbicas a esta edad.

En conjunto, estos resultados contribuyen a validar los ratones 3xTgAD como modelo animal con un buen potencial para estudiar los mecanismos neurales subyacentes a las respuestas conductuales estudiadas y posibles estrategias terapéuticas. Los resultados indican también que las alteraciones no cognitivas aparecen desde edades muy tempranas, antes de que la patología β A pueda ser detectada, sugiriendo que algunos de estos síntomas no cognitivos puedan aparecer en los pacientes con la enfermedad de Alzheimer durante las fases iniciales y moderadas de la enfermedad, años antes de que los síntomas más graves aparezcan. Estos resultados refuerzan así la hipótesis de que la β A intraneuronal es un marcador patogénico temprano para el inicio del deterioro cognitivo, que puede ser relevante para la enfermedad de Alzheimer, previo al inicio de las lesiones neuropatológicas que pueden contribuir a los déficits cognitivos más severos característicos de los estados avanzados de la enfermedad.

Los resultados del Estudio I fueron publicados en artículo de revisión “*Modelling behavioural and neuronal symptoms of Alzheimer’s disease in mice: A role for intraneuronal amyloid*” de Giménez-Llort *et al.* (2007), anexo a esta Tesis (ver “Anexo”).

4.4. CONCLUSIONES ESTUDIO I

- I)** A los 2.5 meses de edad del modelo de ratón 3xTgAD, en la fase de desarrollo de la enfermedad de Alzheimer en que Oddo *et al.* (2003a-b) describen únicamente la presencia de depósitos intraneuronales de β A, los ratones 3xTgAD presentan un leve deterioro cognitivo, mostrando déficit de memoria a corto plazo (RM 1h30) en el test de MWM. Dicha alteración, de la función cognitiva en ratones 3xTgAD a esta edad tan temprana, se detecta por primera vez en el presente estudio.
- II)** El déficit cognitivo que muestran los ratones 3xTgAD de 2.5 meses va acompañado de una ligera alteración a nivel no cognitivo (BPSD), reflejada por una reducción en los niveles de actividad exploratoria vertical en el test de OF. Dicha alteración, probablemente es resultado de un incremento del nivel de ansiedad/temerosidad respecto al grupo control, como demuestra el incremento en el número de defecaciones en el test de OF y la DLB. El presente es el primer estudio en que se han detectado alteraciones de tipo BPSD en el modelo 3xTgAD a esta edad tan temprana.
- III)** A los 6 meses de edad de los ratones 3xTgAD, etapa en la que se ha descrito la acumulación progresiva de la β A intraneuronal acompañada de déficits sinápticos y colinérgicos, los resultados replican aquellos obtenidos por Billings *et al.* (2005) a nivel cognitivo en el MWM, mostrando los animales 3xTgAD déficits de aprendizaje y memoria espacial a corto plazo.
- IV)** A nivel no cognitivo, los resultados demuestran un incremento de los niveles de temerosidad, al tiempo que cierta conducta desinhibida (en el test DLB), en ratones 3xTgAD de 6 meses respecto a los NTg, probablemente como resultado de la afectación de áreas límbicas a esta edad.

- V)** Estos resultados contribuyen a validar los ratones 3xTgAD como modelo animal con un buen potencial para estudiar los mecanismos neurales subyacentes a las respuestas conductuales estudiadas y posibles estrategias terapéuticas.
- VI)** Los resultados indican también que las alteraciones no cognitivas (BPSD) aparecen desde edades muy tempranas, antes de que la patología β A pueda ser detectada, sugiriendo que algunos de estos síntomas no cognitivos puedan aparecer en los pacientes con la enfermedad de Alzheimer durante las fases iniciales y moderadas de la misma, años antes de que los síntomas más graves aparezcan.
- VII)** Estos resultados refuerzan así la hipótesis de que la β A intraneuronal es un marcador patogénico temprano para el inicio del deterioro cognitivo, previo al inicio de las lesiones neuropatológicas que pueden contribuir a los déficits cognitivos más severos característicos de los estados avanzados de la neuropatología en los ratones 3xTgAD y en la enfermedad de Alzheimer.

Estudio II

5. ESTUDIO II

Caracterización del perfil cognitivo y BPSD en estadios avanzados del AD, en ratones 3xTgAD de 12 y 15 meses de edad. Efectos del enriquecimiento ambiental.

5.1. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1.1. Sujetos experimentales

Los animales utilizados fueron machos y hembras de la colonia de ratones 129/C57BL6 triple transgénicos 3xTgAD homocigotos (Tg) y no transgénicos (NTg) creadas en julio del 2004 en la Unidad de Psicología Médica (Departamento de Psiquiatría y Medicina Legal, UAB), del Instituto de Neurociencias, a partir de progenitores recibidos del laboratorio del Dr. Frank LaFerla, del Depto. de Neurobiología y Conducta de la Universidad de California, Irvine, EEUU.

Los ratones fueron mantenidos en grupos de 2 y 3 en las jaulas de macrolón (35 x 35 x 25cm), desde el día del destete de la madre (correspondiente al día 21 desde el nacimiento del individuo) hasta los 6 meses de edad. Una vez llegados a la edad adulta, la mitad de la camada continuó estabulada en grupos de 2 y 3 animales formando el grupo control (sin EA), mientras que la otra mitad se estabuló en las jaulas de enriquecimiento (jaulas de macrolón de 93 x 51 x 38cm) junto con animales de otras familias, formando el grupo enriquecido (con EA) compuesto por 8-10 ratones por jaula. Todas las jaulas con EA contenían animales del mismo sexo y genotipo, aunque de distintas familias. La duración del tratamiento fue de 5.5 meses, iniciándose a los 6 meses de edad de los animales y prolongándose hasta los 11.5 meses,

momento de inicio de la batería conductual. A partir de los 11.5 meses, el grupo EA volvió a ser estabulado en grupos de 2-3 animales por jaula, hasta el final de la fase experimental.

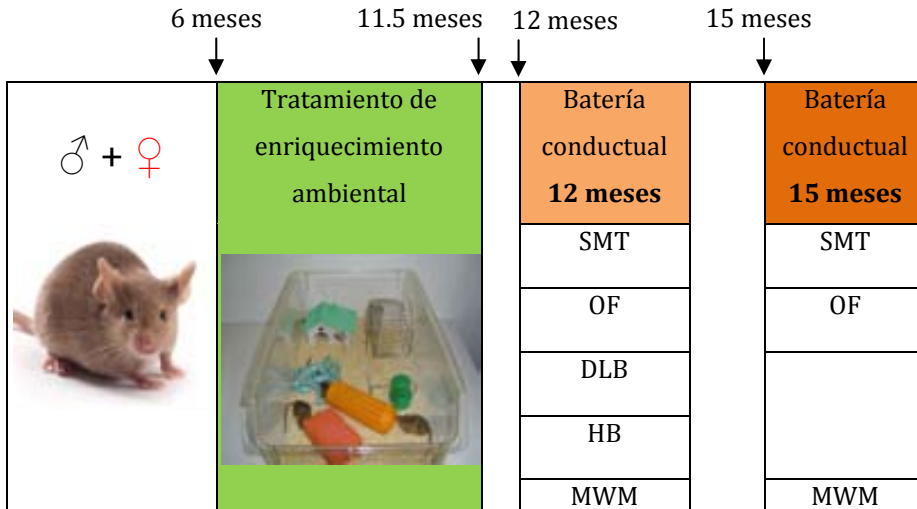


Figura 5.1.- Cronología de la fase experimental del Estudio II. Los animales enriquecidos, fueron estabulados en grupos de 8-10 ratones en jaulas de enriquecimiento ambiental, de los 6 a los 11.5 meses de edad. El grupo control (sin EA) fue estabulado en grupos de 2-3 ratones por jaula hasta el final de la fase experimental.

El número de animales utilizado para este estudio longitudinal fue el siguiente:

12 meses		♂	♀	15 meses		♂	♀
Controles	NTg	9	10	Controles	NTg	9	10
	3xTgAD	9	10		3xTgAD	7	10
EA	NTg	8	12	EA	NTg	8	12
	3xTgAD	10	7		3xTgAD	7	7

Tabla 5.1.- Número de animales utilizados en cada fase del estudio longitudinal.

Todos los animales se mantuvieron bajo condiciones estándares de laboratorio (agua y comida *ad libitum*, $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ de temperatura, 50-70% de humedad, 12 horas de luz/oscuridad con inicio a las 08:00h) y los experimentos se llevaron a cabo entre las 09:00h y las 19:00h. Y los genotipos fueron confirmados mediante PCR de biopsias de colas en el Instituto Karolinska.

Todos los procedimientos experimentales descritos a continuación fueron previamente aprobados por el “Comité de ética para la experimentación animal y humana” de la Universidad Autónoma de Barcelona (CEEAH), y toda la investigación se llevó a cabo bajo la legislación española sobre “Protección de animales utilizados para la experimentación y otros fines científicos” y de conformidad con la Directiva de la Unión Europea (UE 08-88) sobre este tema.

5.1.2. Tratamiento de enriquecimiento ambiental

El tratamiento de enriquecimiento ambiental (EA) consistió en la estabulación de ratones del mismo sexo y genotipo, en jaulas de macrolón de 93 x 51 x 38cm de tamaño, formando grupos de 8-10 animales por jaula. La organización espacial interior de las jaulas se modificaba dos veces a la semana, introduciendo objetos diferentes, como por ejemplo pelotas, túneles, etc., con variedad de formas, colores y texturas. En el interior de la jaula de enriquecimiento también había una caseta y una “rueda de correr” para ratones que se mantuvieron de forma permanente durante todo el tiempo de tratamiento.

Los ratones del grupo control, se mantuvieron estabulados en condiciones estándar desde el momento del destete hasta la fase final del estudio a los 15 meses de edad, en jaulas de macrolón de 35 x 35 x 25cm de tamaño, en grupos de 2-3 animales por jaula.

Todos los animales, tanto del grupo control como del grupo EA, fueron manipulados una vez por semana para el cambio de la viruta de las jaulas.



grupo control



grupo enriquecido

Figura 5.2.- Estabulación de los animales en un grupo control (izquierda) y con enriquecimiento ambiental (derecha).

El tratamiento de EA se inició en la etapa adulta de los animales, a los 6 meses de edad, cuando Oddo *et al.* (2003a) describen la presencia de inmunoreactividad a la β A intraneuronal en la neocorteza y el hipocampo de los ratones 3xTgAD, además de la aparición de los primeros depósitos extracelulares de β A en la corteza frontal. El tratamiento tuvo una duración de 5.5 meses, y al terminar el tratamiento los animales con EA fueron devueltos a la estabulación ordinaria (en grupos de 2-3 animales, en jaulas de macrolón de 35 x 35 x 25cm de tamaño), hasta el final del estudio. A los 12 meses de edad de los animales, cuando los depósitos extracelulares están ampliamente distribuidos por la corteza y el hipocampo de los ratones 3xTgAD, y hay indicios de la aparición de ovillos intraneuronales de Tau en el hipocampo (Oddo *et al.*, 2003a), se inició la batería conductual con el objetivo de evaluar el perfil cognitivo y emocional de los animales (Tabla 5.2.).

Batería conductual realizada a los 12 meses de edad													
Día	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Test	SMT	OF	DLB	HB	MWM								
					PT	PT	PT	PT	PT	RM	DMP	DMP	CUE
					1	2	3	4	5	1h30	15s	20min	

Tabla 5.2.- *Batería conductual realizada a los 12 meses de edad de los animales. El experimento se realizó en 2 tandas de 35-40 animales (aproximadamente la mitad de cada grupo) separadas por 15 días de diferencia. Siglas de los test definidas en el apartado “Abreviaturas”.*

Una vez finalizada la batería de pruebas conductuales de los 12 meses de edad, los animales fueron estabulados de nuevo en condiciones estándar hasta los 15 meses. A esta edad, Oddo *et al.* (2003b) describen la presencia de las placas de β A y ovillos intraneuronales de Tau ampliamente distribuidos por la corteza y el hipocampo, y es entonces cuando se volvió a evaluar el perfil cognitivo y emocional de los ratones con una nueva batería conductual más reducida (Tabla 5.3.), debido al incremento de la mortalidad de los animales transgénicos resultado de la edad y el desarrollo de la patología.

Batería conductual realizada a los 15 meses de edad											
Día	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Test	SMT	OF	MWM								
			PT 1	PT 2	PT 3	PT 4	PT 5	RM 1h30	DMP 15s	CUE	

Tabla 5.3.- *Batería conductual realizada a los 15 meses de edad de los animales. El experimento se realizó en 2 tandas de 35-40 animales (aproximadamente la mitad de cada grupo) separadas por 15 días de diferencia. Siglas de los test definidas en el apartado “Abreviaturas”.*

5.1.3. Estudios conductuales

A los 12 y posteriormente a los 15 meses de edad, formando parte de un estudio longitudinal, las capacidades físicas, cognitivas y emocionales de los 8 grupos de ratones (machos y hembras, NTg y 3xTgAD, controles y enriquecidos) fueron evaluadas utilizando una batería de test conductuales que comprendía una serie de pruebas sensorio-motoras (*Sensory-motor test*, SMT), el test del Campo abierto (*Open field*, OF), la Caja blanca-y-negra (*Dark-light box*, DLB), el test de la Tabla de agujeros (*Hole Board*, HB), y el test del Laberinto acuático de Morris (*Morris water maze*, MWM).

5.1.3.1. Pruebas sensorio-motoras

Las condiciones físicas de los animales, comprendiendo el reflejo visual, el equilibrio, la fuerza y la coordinación motora, fueron evaluadas mediante diversas pruebas sensorio-motoras comentadas a continuación.

Test de las esquinas

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

En este test se evalúa la conducta exploratoria espontánea del animal durante un periodo de 30 segundos y se anota el número de esquinas o "*corners*" explorados (el animal tiene que oler y explorar la esquina aunque sea durante escasos segundos) y el número de "*rearings*" o levantamientos (el animal tiene

que levantar las patas delanteras) realizados. En esta prueba se utiliza una jaula distinta para cada animal, para evitar posibles interferencias en la conducta debido al rastro de olor de otro animal.



Figura 5.3.- *Test de las esquinas (Corner test)*

Prueba del reflejo visual

Consistió en depositar el ratón sobre una plancha de plástico negra (32 x 32cm), cogiéndolo por la cola y aproximándolo lentamente a la superficie. Se utilizaron 2 ensayos consecutivos para cada animal, con el objetivo de determinar la presencia o ausencia de reflejo visual, entendido como el alargamiento de las patas delanteras para evitar golpearse con el morro en la plancha.



Figura 5.4.- *Test del reflejo visual*

Pruebas de la barra de madera y la barra metálica

Estos test se realizaron de manera consecutiva, testando primero el animal en la prueba de la barra de madera, y posteriormente en la barra metálica. Ambos test presentaban el mismo procedimiento. Consistieron en colocar el animal encima de una barra (en el primer test la barra era cuadrada y de madera; en el segundo test la barra era cilíndrica de 1cm de diámetro y metálica), de 40cm de largo, dividida en 8 segmentos de 5cm de tamaño y elevada a 40cm del suelo. El ratón fue colocado en el centro de la barra durante dos ensayos consecutivos de 20s cada uno, y se midió la “latencia de caída de la barra”, así como el “número de segmentos recorridos”. Estas pruebas sirvieron para evaluar tanto el reflejo de equilibrio como de coordinación motora del animal. Entre los dos ensayos llevados a cabo en cada barra dejamos descansar el animal 20 segundos.



Figura 5.5.- *Test de la barra de madera (izquierda) y de la barra metálica (derecha)*

Prueba de la percha metálica

Consistió en colgar suavemente el ratón por las extremidades delanteras del centro de una percha metálica (de 2mm de diámetro y 40cm de largo) elevada a 40cm del suelo, y dividida en 8 segmentos de 5cm de longitud. Realizamos dos ensayos de 5 segundos cada uno (de los cuales obteníamos la media para el posterior análisis estadístico) y un tercer ensayo de 60 segundos de duración, con intervalos de descanso de 20s. En esta prueba medimos la “latencia de caída” y el “número de segmentos recorridos”, con el objetivo de evaluar la resistencia y fuerza de agarre, así como la coordinación motora de los animales.



Figura 5.6.- *Test de la percha metálica*

5.1.3.2. Campo abierto

Se trata de una prueba clásica de las baterías conductuales en la que el animal se expone a un ambiente nuevo, abierto e iluminado (Crawley, 1985; Walsh y Cummins 1976). La conducta del roedor en este espacio está determinada por el equilibrio entre el interés natural por la novedad (conducta exploratoria) y el miedo a los espacios desconocidos, abiertos e iluminados (temerosidad/ansiedad). El aparato utilizado en el test del Campo abierto (*Open Field*, OF) consiste en una caja de madera blanca (55 x 55 x 25cm de

altura), dividida en 25 cuadrados dibujados en la base, que permiten contabilizar los desplazamientos horizontales del animal. El ratón fue colocado en el centro del aparato y su conducta evaluada durante 5 minutos. Las variables que medimos fueron la actividad locomotora horizontal (número de cruces o *crossings*) y vertical (número de levantamientos o *rearings*) total, y minuto a minuto, y conductas relacionadas con la temerosidad como son el número de defecaciones.



Figura 5.7.- *Test del Campo abierto*

5.1.3.3. Caja blanca-y-negra

Se trata de un test de ansiedad que se ha convertido en todo un clásico en los últimos años. El aparato de la Caja blanca-y-negra consta de dos compartimentos blanco/iluminado y negro/oscurο que se fundamenta en la preferencia etológica de los roedores (animales nocturnos) por lugares oscuros y aversión por los claros o iluminados (Bourin *et al.*, 2003; Ramos *et al.*, 1997). Este aparato se utiliza en diferentes versiones dependiendo del lugar en donde colocamos inicialmente el animal (en el compartimento blanco o el negro) o el tipo de iluminación que utilizamos (diversos grados). La Caja blanca-y-negra (Panlab, S.L., Barcelona, Spain) estaba constituida por dos compartimentos (negro: 27 x 18 x 27cm; blanco: 27 x 27 x 27cm) separados por una pared con una abertura (7 x 7cm) que conectaba los dos espacios. El

compartimento negro estaba a oscuras, mientras que el compartimento blanco estaba iluminado por una luz blanca que incrementaba la aversión de los roedores por este espacio. Se escogieron estas condiciones de iluminación porque en estudios previos realizados en nuestro laboratorio con ratones 3xTgAD de 6 meses de edad (ver “Resultados” Estudio I), se había observado que la luz roja utilizada en el compartimento blanco no generaba suficiente aversión en los roedores para discriminar de manera evidente entre los diferentes niveles de ansiedad/temerosidad que existían entre el genotipo NTg y el 3xTgAD. El sujeto se colocó en el compartimento negro, de espaldas a la apertura, encarado hacia la pared y se observó su conducta durante 5 minutos. El nivel de ansiedad se evaluó mediante la “latencia de entrada con las cuatro patas al compartimento blanco”, el “número total de entradas”, el “tiempo pasado en el compartimento blanco” y el “número de defecaciones”.



Figura 5.8.- *Caja blanca-y-negra*

5.1.3.4. Tabla de agujeros

El test de la Tabla de agujeros (*Hole Board*, HB) es una prueba utilizada para medir actividad locomotora/exploratoria estudiando la conducta de los animales dirigida a los agujeros del suelo. El aparato consistía en una caja blanca de madera (32 x 32 x 20cm) con 4 agujeros equidistantes de 3.5cm de

diámetro en el suelo, el cual estaba dividido en 36 cuadrados iguales (de 5 x 5cm) con líneas negras. En el interior de los agujeros se puede presentar, o no, algún objeto, con la intención de estimular la exploración de los animales (Crawley, 1985; File y Wardill, 1975). En este estudio se optó por no poner objetos siguiendo el protocolo llevado a cabo en trabajos previos (p. ej. Estudio I; Giménez-Llort *et al.*, 2002). Esta prueba se considera que es indicativa de la curiosidad del animal por explorar ambientes nuevos, aunque tiene un componente de ansiedad asociado. El test de 5 minutos de duración, consistió en colocar el animal orientado hacia una esquina de la pared del test y valorar la conducta exploratoria desarrollada por el sujeto en torno a los agujeros a partir del “número de *head-dips*” (o las veces que el animal introduce la cabeza en uno de los agujeros) y el “tiempo acumulado de *head-dipping*” (tiempo que el animal pasa con la cabeza dentro de los agujeros). También se contabilizaron las “defecaciones”.



Figura 5.9.- *Tabla de agujeros*

Todas las pruebas fueron grabadas con video-cámara y posteriormente reanalizadas para la evaluación de diversas variables. Los aparatos se limpiaron con etanol diluido en agua al 5%, antes de la entrada de cada animal al test, para la eliminación de olores.

5.1.3.5. Laberinto acuático de Morris

Los posibles déficits cognitivos de los ratones en el aprendizaje y memoria espacial, fueron evaluados utilizando el Laberinto acuático de Morris (MWM), en diversos paradigmas o tareas que dependen fundamentalmente de la integridad de la función del hipocampo, área diana afectada en la enfermedad de Alzheimer por acumulación de la patología amiloide y neurofibrilar.

Los animales fueron entrenados para localizar la plataforma (de 16 cm de diámetro) en una piscina circular (140 cm de diámetro y 60 cm de profundidad, de agua opaca a 24°C) localizada en una sala con diversas señales visuales que ayudaban al animal a orientarse y recordar donde se encontraba la plataforma (Escorihuela *et al.*, 1995b, 1998; Morris 1984; Whishaw, 1995; Wolfer *et al.*, 1998). Los animales que no encontraban la plataforma durante los 60s que duraba el ensayo fueron situados encima de la plataforma durante 15s, el mismo tiempo que permanecían encima los animales que lo conseguían. Todas las sesiones o ensayos fueron grabados y analizados por el sistema de análisis computerizado SMART (Panlab S.L, Barcelona, Spain).



Figura 5.10.- *Laberinto acuático de Morris.*

Días del 1 al 5: Tarea de aprendizaje espacial de referencia o Prueba de adquisición (*Place task, PT*)

El ratón fue liberado en la piscina orientado hacia la pared, des de uno de los puntos de salida escogido al azar (orientación norte “N”, sur “S”, este “E” y oeste “W”), permitiendo que nadase hasta encontrar la plataforma (sumergida 1.5cm bajo la superficie del agua y situada en el centro del cuadrante SE), en un tiempo máximo de 60 segundos por ensayo. Los animales que no hallaron la plataforma durante este tiempo, se colocaron sobre la plataforma durante 15 segundos. Se realizaron 4 ensayos por día (con un intervalo de 15 minutos entre ensayos) durante 5 días, tiempo en que los 2 grupos de ratones alcanzaron valores asintóticos en la curva de aprendizaje espacial de referencia. La capacidad de recordar la localización de la plataforma se evaluó observado “la latencia” (o tiempo que tarda el animal) de llegada a la plataforma sumergida, la “distancia recorrida” y la “velocidad de natación”.

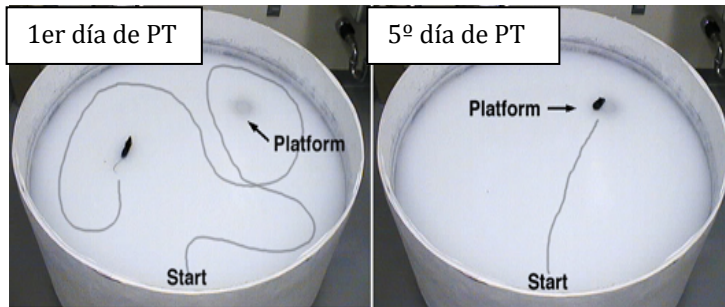


Figura 5.11.- *Ejemplo de distancias recorridas por los ratones el 1er (fotografía izquierda) y 5º día (fotografía derecha) en la tarea de aprendizaje espacial de referencia.*

Día 5: Test de memoria sin plataforma a la 1:30 (*Removal 1h30, RM1h30*)

Una hora y media después de finalizar el último ensayo (5º día) de la tarea de adquisición, la capacidad de retención (memoria) a corto plazo fue evaluada. La plataforma se extrajo de la piscina y el animal, que se liberó desde el

cuadrante opuesto donde se encontraba la plataforma, realizó un ensayo de 60s de duración. La capacidad de retención (o memoria a corto plazo) se evaluó mediante el “número total de cruces” (*annulus crossings, a.c.*) que hacía el ratón de la zona donde se encontraba la plataforma en la tarea de adquisición (*Place task*), el “% de distancia recorrida en el cuadrante P” respecto a la distancia total (% de preferencia por el cuadrante P, siendo P el cuadrante donde se hallaba la plataforma en la PT) y la “distancia recorrida hasta realizar el primer a.c.”.

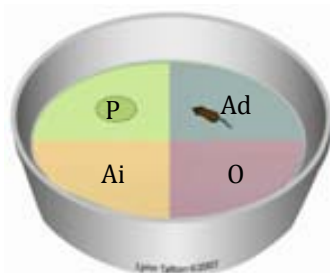


Figura 5.12.- Piscina dividida en cuadrantes mediante el programa informático SMART (Panlab S.L, Barcelona, Spain). Cuadrantes: “P” posición donde se hallaba la plataforma en la tarea de PT, “Ad” posición adyacente derecha a P, “Ai” posición adyacente izquierda a P, “O” posición opuesta a P.

**Día 6: Test de “emparejamiento retardado -15s- a una posición” (15s-
Delayed matching-to-place, DMP-15s)**

El paradigma del Laberinto acuático de Morris de “emparejamiento retardado 15 segundos a una posición” (15s-*Delayed matching-to-place, DMP-15s*) se utilizó para la evaluación de la memoria de trabajo de los ratones, en una tarea que es dependiente del hipocampo, tal como describieron originalmente Steele y Morris (1999). Como en la tarea de aprendizaje espacial de referencia

realizada previamente, el animal se orienta utilizando las señales de la sala donde se encuentra la piscina de Morris.

Esta prueba constó de 2 ensayos diarios, durante 4 días consecutivos. La plataforma sumergida 1,5cm bajo la superficie se mantuvo en la misma posición durante los 2 ensayos diarios, cambiando su localización día tras día. Los animales fueron depositados en la piscina de cara a la pared, entrando en cada uno de los ensayos por una localización distinta. El intervalo tiempo entre el primer y segundo ensayo diario fue de 15s, con el objetivo de evaluar la memoria de trabajo de los ratones. A continuación viene indicada la localización de la plataforma para cada uno de los 4 días en la tarea de DMP-15s, así como la posición de entrada de los animales para cada uno de los ensayos.

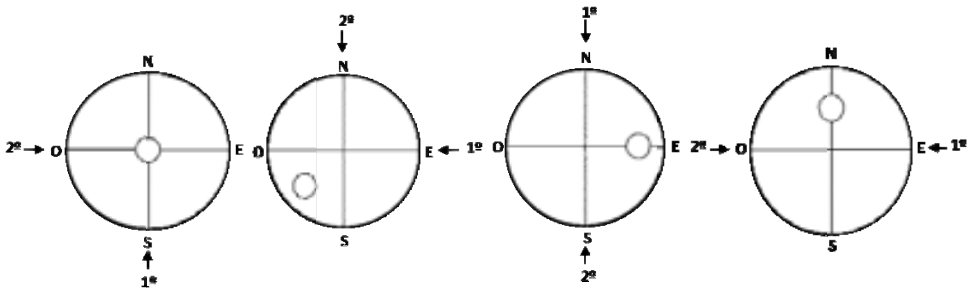


Figura 5.13.- Localización diaria de la plataforma y punto de entrada de los ratones de 12 y 15 meses de edad, en la tarea de DMP-15s.

Las distancias recorridas ensayo por ensayo fueron calculadas mediante el programa informático SMART (PanLab, S.L., Barcelona, Spain). Posteriormente, a partir de las distancias obtenidas en el SMART, se calculó las “distancias medias diarias” (obtenidas a partir de la media de los 2 ensayos), y la “diferencia entre la media de los primeros ensayos y la media de los segundos ensayos” (resta de la media de los 4 días de los primeros ensayos, menos la media de los segundos ensayos).

Día 7: Test de “emparejamiento retardado -20min- a una posición (20min-Delayed matching-to-place, DMP-20min)”

El test de “emparejamiento retardado -20 minutos- a una posición” (20min-Delayed matching-to-place, DMP-20min) se utilizó para la evaluación de la memoria a corto plazo de los ratones, en una tarea que es dependiente del hipocampo (Steele y Morris, 1999), con un tiempo más prolongado que el usado en el paradigma anterior de 15s de diferencia entre ensayos (ver punto anterior “DMP-15s”). Como en el resto de tareas de aprendizaje espacial realizadas previamente, el animal se orienta utilizando las señales de la sala donde se encuentra la piscina de Morris.

Esta prueba constó de 2 ensayos diarios, separados por un intervalo de tiempo de 20 minutos, durante 4 días consecutivos. La localización de la plataforma sumergida cambió diariamente, manteniéndose constante entre los 2 ensayos diarios. Los animales fueron depositados en la piscina encarados hacia la pared, entrando en cada uno de los ensayos por una localización distinta. A continuación viene indicada la posición de la plataforma para cada uno de los 4 días de tarea de DMP-20min, así como la posición de entrada de los animales para cada uno de los ensayos.

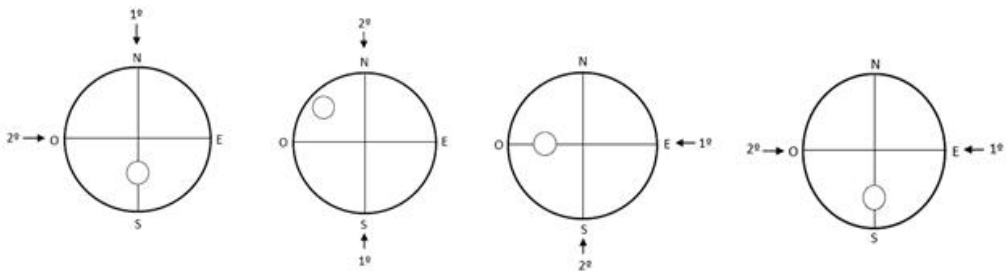


Figura 5.14.- Localización diaria de la plataforma y punto de entrada de los ratones de 12 meses de edad, en la tarea de DMP-20min.

Las distancias recorridas ensayo por ensayo fueron calculadas mediante el programa informático SMART (PanLab, S.L., Barcelona, Spain). Posteriormente, a partir de las distancias obtenidas en el SMART, se calcularon las “distancias medias diarias” (obtenidas a partir de la media de los 2 ensayos) y la “diferencia entre la media de los primeros ensayos y la media de los segundos ensayos” (resta de la media de los 4 días de los primeros ensayos, menos la media de los segundos ensayos).

Día 8: Test de aprendizaje guiado por señales locales (Cue task)

En esta tarea la plataforma se colocó sobresaliendo aproximadamente 1cm sobre la superficie del agua, señalada con una bandera (con rallas de color blanco y negro, de 5 × 8 × 15cm) que servía como señal o estímulo visual externo para el animal. La plataforma se situó en el cuadrante opuesto (NO) donde se encontraba durante la tarea de adquisición. Se realizaron 4 ensayos con entradas al azar (orientación, N, S, E, O) con intervalos de 15 minutos entre ensayos, y se evaluó la “distancia recorrida por los ratones para hallar la plataforma” y la “velocidad de natación”. De esta manera, se descarta la posibilidad de que los animales presenten problemas visuales, motores y/o motivacionales para encontrar la plataforma en el resto de tareas comentadas anteriormente.



Figura 5.15.- *Test de aprendizaje guiado por señales locales (Cue task)*

5.1.4. Análisis estadísticos

Para realizar los análisis estadísticos se utilizó el programa estadístico SPSS (versión 15.0-17.0). Los datos de ambas edades (12 y 15 meses) fueron tratados conjuntamente y por separado, para detectar cambios en el estudio longitudinal de la conducta de los ratones. Los resultados se expresan como media \pm error estándar de la media (SEM).

Para comparar los diferentes genotipos, tratamientos, sexos y edades, se realizaron análisis factoriales de la varianza, con y sin el factor “edad”, mediante ANOVAs (2 “genotipo” x 2 “tratamiento” x 2 “sexo” x 2 “edad”), seguidos de contrastes *post-hoc* utilizando la prueba de Duncan cuando se detectaban interacciones significativas.

Para el análisis de la tarea de aprendizaje espacial de referencia en el MWM, así como en la tarea del “emparejamiento retardado a una posición” (DMP), se realizó un análisis de la varianza de medidas repetidas (MANOVA) para el efecto “día” (factor de repetición: 5 y 4 días respectivamente) de 3 factores (genotipo x tratamiento x sexo) para cada una de las edades. Además, en el análisis de los datos de la tarea de aprendizaje espacial de referencia, día por día independientemente, para cada uno de los sexos por separado, también se utilizó un análisis de la varianza de medidas repetidas MANOVA (4 “ensayo” x 2 “genotipo” x 2 “tratamiento”) de dos factores (genotipo x tratamiento) con medidas repetidas para el efecto “ensayo” (factor de repetición: 4 ensayos). En las interacciones estadísticamente significativas, las comparaciones entre grupos se hicieron mediante pruebas Duncan como pruebas *post-hoc*. En el MANOVA, cuando no se alcanzaba la esfericidad de Mauchly, se utilizó la corrección de Huynh-Feldt.

En todos los casos, la significación estadística se consideró a partir de un nivel de significación $P < 0.05$.

5.2. RESULTADOS ESTUDIO II

Caracterización del perfil cognitivo y de conducta exploratoria y ansiosa en situaciones de novedad, en animales de 12 y 15 meses de edad. Efectos del enriquecimiento ambiental.

5.2.1. 12 meses de edad

5.2.1.1. Pruebas de resistencia física, Test del reflejo visual y Test de las esquinas

Las características físicas de los animales a los 12 meses de edad fueron evaluadas en diversas pruebas sensorio-motoras (ver Tabla 5.4). Las pruebas visuales señalaron que los ratones 3xTgAD de ambos sexos no muestran ningún tipo de disfunción visual (resultados no mostrados).

Los animales 3xTgAD no muestran déficits motores a los 12 meses de edad (ver Tabla 5.4.), mostrando incluso capacidades motoras superiores que el grupo NTg en algunas pruebas. Por El tratamiento de EA muestra algunos efectos, principalmente en machos. Así en los machos enriquecidos presentan mayor “latencia de caída” y mayor “número de segmentos recorridos en la barra de madera”, así como menor “latencia de caída” y menor “número de extremidades con las que se sujetan en la prueba de la percha-60s” (ver significaciones estadísticas en la siguiente Tabla 5.4.). En cuanto al peso, el ANOVA “2 “sexo” x 2 “genotipo” x 2 “tratamiento”” indica que globalmente los animales 3xTgAD pesan más que los NTg (ANOVA efecto “genotipo”: $F_{1,71}=8.74$, $P<0.005$), siendo este efecto más obvio en machos que en hembras (ANOVA efecto “genotipo x tratamiento”: $F_{1,71}=5.72$, $P<0.05$).

En el caso de la conducta neofóbica en el Test de las esquinas, los resultados del ANOVA “2 “sexo” x 2 “genotipo” x 2 “tratamiento”” indican que,

globalmente, los animales 3xTgAD realizan menos levantamientos que los NTg (efecto “genotipo”: $F_{1,71}=9.53$, $P<0.005$) y, además, los machos exploran menos esquinas que las hembras (efecto “sexo”: $F_{1,71}=8.87$, $P<0.05$).

Tabla 5.4. (1a parte)

	Machos de 12 meses				Valor F g.l.(1,36)	$P \leq$
	NTg		3xTgAD			
	control n=11	EA n=8	control n=11	EA n=10		
Peso (g)	32.11 ± 0.85	32.57 ± 1.20	41.06 ± 3.18	39.68 ± 2.43	G 12.61	0.001
<u>Test de las esquinas</u>						
Nº corners	7.45 ± 1.21	8.25 ± 1.20	5.73 ± 1.06	6.60 ± 1.51	G 1.76	<i>n.s.</i>
Nº rearings	1.91 ± 0.45	3.75 ± 1.03	1.45 ± 0.80	0.50 ± 0.34	G 7.42 GxT 4.23	0.01 0.05
Nº defecaciones	0.18 ± 0.18	0.00 ± 0.00	0.27 ± 0.19	0.30 ± 0.15	G 1.36	<i>n.s.</i>
<u>Barra de madera</u>						
Lat. caída (s)	16.36 ± 1.67	20.00 ± 0.00	19.43 ± 0.57	20.00 ± 0.00	G 2.41 T 4.55	<i>n.s.</i> 0.05
Nº segmentos	0.36 ± 0.12	2.69 ± 1.17	0.91 ± 0.58	2.70 ± 0.84	G 0.15 T 8.39	<i>n.s.</i> 0.05
<u>Barra de hierro</u>						
Lat. caída (s)	3.62 ± 0.90	4.52 ± 1.10	8.30 ± 2.81	7.50 ± 1.99	G 3.75	<i>n.s.</i>
Nº segmentos	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.15 ± 0.07	G 3.79	<i>n.s.</i>
<u>Percha-5s</u>						
Lat. caída (s)	3.64 ± 0.60	1.50 ± 0.46	4.45 ± 0.25	3.10 ± 0.43	G 6.79 T 14.16	0.05 0.001
Nº segmentos	0.45 ± 0.20	0.00 ± 0.00	0.36 ± 0.20	0.30 ± 0.15	G 0.34	<i>n.s.</i>
Nº extremidades	2.81 ± 0.22	2.25 ± 0.25	2.82 ± 0.29	2.30 ± 0.30	G 0.008	<i>n.s.</i>
<u>Percha-60s</u>						
Lat. caída (s)	10.46 ± 5.06	7.43 ± 3.09	38.74 ± 7.24	15.85 ± 7.47	G 8.42 T 4.20	0.05 0.05
Nº segmentos	1.27 ± 0.43	0.75 ± 0.53	3.36 ± 0.75	0.60 ± 0.39	G 2.96	<i>n.s.</i>
Nº extremidades	2.91 ± 0.44	2.62 ± 0.46	3.54 ± 0.36	2.80 ± 0.44	G 0.89 T 8.48	<i>n.s.</i> 0.05

Tabla 5.4. (2a parte)

	Hembras de 12 meses				Valor F g.l. (1,35)	P ≤
	NTg		3xTgAD			
	control n=10	EA n=12	control n=10	EA n=7		
Peso (g)	35.52 ± 1.66	34.66 ± 1.76	35.17 ± 1.33	36.66 ± 3.34	G 1.17	<i>n.s.</i>
<u>Test de las esquinas</u>						
Nº <i>corners</i>	10.30 ± 1.44	8.75 ± 1.01	10.10 ± 1.39	9.71 ± 1.19	G 0.09	<i>n.s.</i>
Nº <i>rearings</i>	4.40 ± 0.76	2.75 ± 0.59	2.40 ± 0.83	2.00 ± 1.07	G 2.97	<i>n.s.</i>
Nº defecaciones	1.20 ± 0.89	0.33 ± 0.19	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	G 2.53	<i>n.s.</i>
<u>Barra de madera</u>						
Lat. caída (s)	15.80 ± 1.70	19.52 ± 0.47	20.00 ± 0.00	20.00 ± 0.00	G 6.20	0.05
Nº segmentos	0.60 ± 0.22	3.12 ± 0.76	2.00 ± 0.65	2.21 ± 0.88	G 0.13	<i>n.s.</i>
<u>Barra de hierro</u>						
Lat. caída (s)	4.30 ± 1.51	7.37 ± 1.35	9.20 ± 2.25	9.90 ± 2.18	G 4.12	0.05
Nº segmentos	0.10 ± 0.10	0.17 ± 0.11	0.10 ± 0.10	0.28 ± 0.18	G 0.24	<i>n.s.</i>
<u>Percha-5s</u>						
Lat. caída (s)	2.20 ± 0.51	2.42 ± 0.51	3.10 ± 0.43	3.14 ± 0.63	G 2.35	<i>n.s.</i>
Nº segmentos	0.00 ± 0.00	0.41 ± 0.19	0.20 ± 0.13	0.71 ± 0.36	G 1.70 T 5.96	<i>n.s.</i> 0.05
Nº extremidades	2.20 ± 0.13	2.67 ± 0.33	2.20 ± 0.13	2.71 ± 0.28	G 0.009	<i>n.s.</i>
<u>Percha-60s</u>						
Lat. caída (s)	2.50 ± 1.11	9.00 ± 4.91	29.13 ± 8.54	24.12 ± 11.08	G 9.56	0.005
Nº segmentos	0.00 ± 0.00	1.00 ± 0.52	1.80 ± 0.68	1.57 ± 0.75	G 4.56	0.05
Nº extremidades	1.90 ± 0.10	2.67 ± 0.46	3.50 ± 0.43	3.14 ± 0.67	G 5.45	0.05

Tabla 5.4.- Pruebas sensorio-motoras de machos y hembras NTg y 3xTgAD, controles y enriquecidos (EA) de 12 meses de edad (n=7-12 por grupo). Los resultados se expresan como media ± error estándar. **G**, efecto "genotipo"; **T**, efecto "tratamiento"; **GxT**, efecto "genotipo x tratamiento". Las F y y significaciones estadísticas (P) están indicadas en la tabla.

5.2.1.2. Conducta en el test del Campo abierto

Para comprobar si existen diferencias en el patrón de actividad exploratoria y locomotora de los ratones transgénicos versus los NTg, además de comprobar cuáles son los efectos que produce el tratamiento de enriquecimiento ambiental sobre ambos genotipos, los animales fueron testados en la prueba del Campo abierto. Para ello, se llevó a cabo un ANOVA de los resultados obtenidos en el test, de machos y hembras de 12 meses de edad. Los resultados muestran que existen diferencias sexuales en diversas variables analizadas mediante el ANOVA “2 “sexo” x 2 “genotipo” x 2 “tratamiento””, y es por eso que los datos fueron analizados posteriormente de manera independiente para la variable “sexo”. De este modo encontramos que los machos muestran una mayor “latencia de llegada a la periferia” que las hembras, después de introducirlos en el centro del Campo abierto para iniciar el test (ANOVA efecto “sexo”: $F_{1,59}=4.54$, $P<0.05$). La “actividad exploratoria total” a lo largo de la sesión de 5 minutos de test, entendida como la suma del “número de cruces total más el número de levantamientos total”, también es menor en machos que en hembras (efecto “sexo”: $F_{1,59}=16.15$, $P<0.001$). En conclusión, las diferentes variables indican que, globalmente, los machos realizan menos actividad que las hembras en la prueba del Campo abierto, indicando que, probablemente, también se muestren más ansiosos/temerosos que las hembras. A continuación, los dos sexos serán analizados de modo independiente para ver mejor las diferencias en los genotipos y de tratamiento.

La Figura 5.16. muestra la “latencia de movimiento” de los 4 grupos de machos (A) y hembras (B) NTg y 3xTgAD, no tratados y enriquecidos, de 12 meses de edad. El ANOVA de los resultados de los 2 sexos analizados conjuntamente indica que, los machos transgénicos muestran respecto a los NTg una mayor “latencia de movimiento inicial” (entendido como una característica ansiosa de los animales), mientras que este efecto de inmovilidad al inicio del test no se observa en las hembras (efecto “genotipo x sexo”: $F_{1,59}=5.34$, $P<0.05$). De este

modo, en la Figura 5.16.A se representa la mayor “latencia de movimiento” inicial de los machos 3xTgAD respecto a los NTg (ANOVA “2 x “genotipo” x 2 x “tratamiento”, efecto “genotipo”: $F_{1,32}= 4.94$, $P<0.05$). Mientras que en el caso de las hembras (Fig. 5.16.B) no se observan diferencias significativas en cuanto al genotipo (ANOVA, efecto “genotipo”: $F_{1,32}= 0.03$, *n.s.*).

En la Figura 5.16.C-D, en concordancia con lo anterior, también se indica que machos (C) y hembras transgénicos (D) muestran mayores “latencias de entrada a la periferia” debido a la inmovilidad inicial comentada anteriormente (ANOVA efecto “genotipo”: $F_{1,32}= 19.86$, $P<0.001$ para machos; $F_{1,35}=6.88$, $P<0.05$ para hembras).

Asimismo, tal y como se muestra en la Fig. 5.16.E-F, al analizar el “número de defecaciones” depositadas por los 4 grupos de machos (E) y hembras (F), el ANOVA “2 x “sexo” x 2 “genotipo” x 2 “tratamiento”” de los resultados muestra un efecto “genotipo” ($F_{1,59}= 25.32$, $P<0.001$) donde los animales 3xTgAD depositan un mayor número de defecaciones que los NTg. Cuando se analizan los 2 sexos de manera independiente, el ANOVA muestra que mientras que en el caso de los machos solamente se observa una tendencia de los 3xTgAD a defecar más (ver Fig. 5.16.E; $F_{1,32}=2.64$, *n.s.*), entendida como una posible medida de ansiedad, en el caso de las hembras (Fig. 5.16.F) esta diferencia de las 3xTgAD es estadísticamente significativa ($F_{1,35}=24.56$, $P<0.001$).

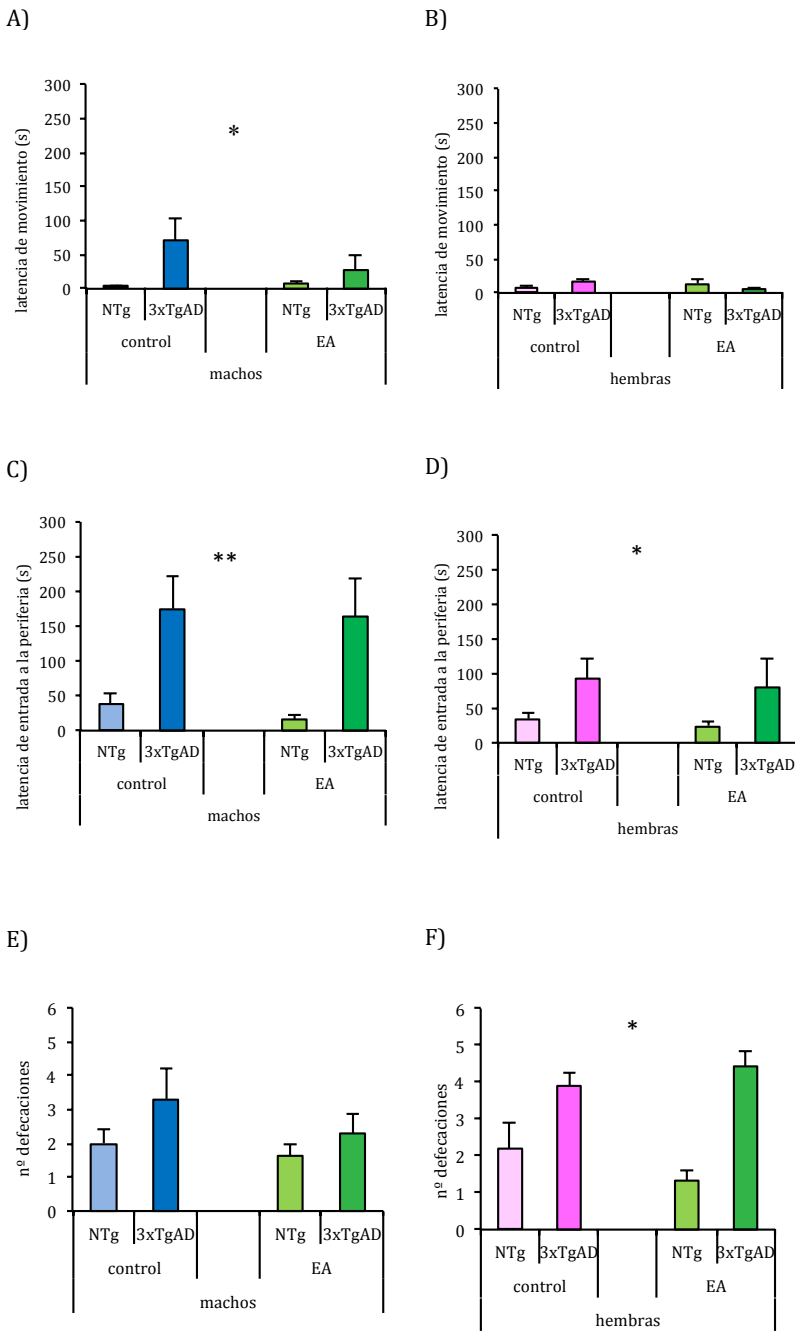


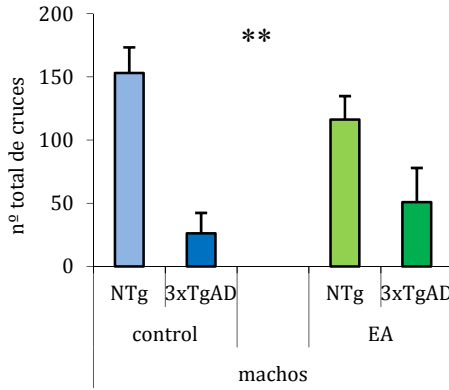
Figura 5.16.- Latencia de movimiento (A-B), latencia de entrada a la periferia (C-D) y número de defecaciones (E-F) de machos (izquierda) y hembras (derecha) de 12 meses de edad, NTg y 3xTgAD, no tratados y tratados con EA, en el test de Campo abierto (n=7-12 por grupo). Los resultados se representan como media \pm error estándar. *P<0.05 y ** P<0.001 efecto "genotipo".

La Figura 5.17.A-B representa la conducta exploratoria y locomotora de los animales NTg y 3xTgAD, controles y enriquecidos de ambos sexos, de 12 meses de edad. Globalmente, el ANOVA de ambos sexos indica que los animales 3xTgAD muestran una menor actividad exploratoria horizontal en el test que los NTg (ANOVA “2 x “sexo” x 2 “genotipo” x 2 “tratamiento”, efecto “genotipo”: $F_{1,59}=14.02$, $P<0.001$), y esta diferencia en el “número de cruces” se hace más evidente en machos 3xTgAD que en hembras (ANOVA “2 x “sexo” x 2 “genotipo” x 2 “tratamiento”, efecto “genotipo x sexo”: $F_{1,59}=8.61$, $P\leq 0.005$).

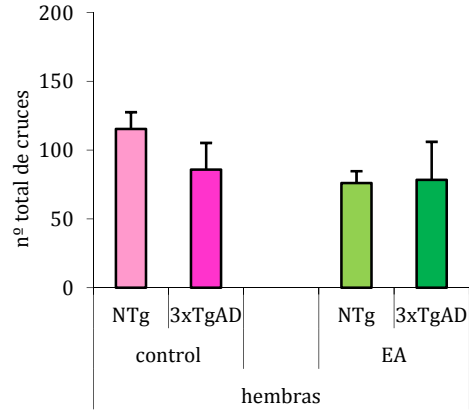
Cuando analizamos los datos de ambos sexos de manera individual, debido a las diferencias sexuales comentadas anteriormente, observamos que en el caso de los machos (Fig. 5.17.A) el grupo 3xTgAD muestra una menor actividad global en relación a los NTg (ANOVA efecto “genotipo”: $F_{1,32}=29.60$, $P<0.001$). Mientras que por lo que respecta a las hembras (Fig. 5.17.B), el ANOVA de los resultados indica que la diferencia entre genotipos en cuanto a la actividad exploratoria horizontal no llega a ser significativa (ANOVA efecto “genotipo”: $F_{1,35}=0.67$ *n.s.*) (Fig. 5.17.B).

En cuanto a la conducta exploratoria vertical (Fig. 5.17.C-D), el ANOVA “2 x “sexo” x 2 x “genotipo” x 2 x “tratamiento”” indica que los ratones 3xTgAD realizan un menor “número de levantamientos totales” que los animales NTg (efecto “genotipo”: $F_{1,59}=18.96$, $P<0.001$), y que esta diferencia entre genotipos varía en función del sexo (ANOVA “2 “sexo” x 2 “genotipo” x 2 “tratamiento”, efecto “genotipo x sexo”: $F_{1,59}=6.70$, $P<0.05$). Así, de igual modo que sucedía con el patrón de actividad horizontal, encontramos que los machos 3xTgAD muestran claramente un menor número de exploraciones verticales respecto a los NTg (ANOVA “2 “genotipo” x 2 “tratamiento””: $F_{1,32}=21.79$, $P<0.001$) (Fig. 5.17.C), mientras que en el caso de las hembras la diferencia entre genotipos no llega a la significación estadística (efecto “genotipo”: $F_{1,35}=2.18$, *n.s.*) (Fig. 5.17.D).

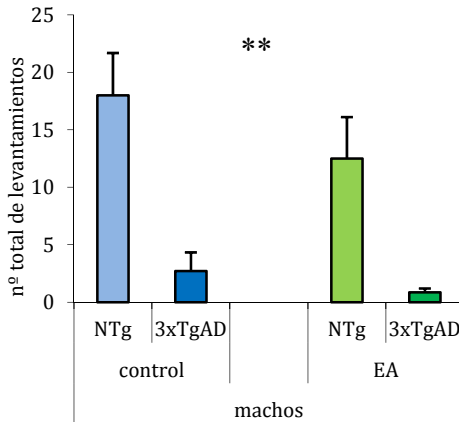
A)



B)



C)



D)

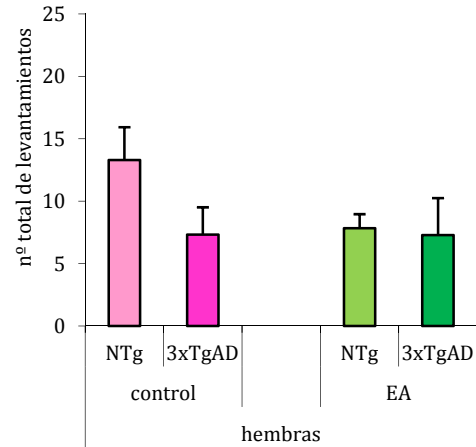


Figura 5.17.- Número total de cruces (A-B) y levantamientos (C-D) de machos (A,C) y hembras (B,D) NTg y 3xTgAD, no tratados (controles) y con enriquecimiento ambiental (EA), de 12 meses de edad (n=7-12 por grupo). Los resultados se expresan como medias \pm error estándar. **P<0.001 efecto "genotipo".

Cuando analizamos la variable “número de cruces+levantamientos totales” para ambos sexos conjuntamente, los resultados del ANOVA “2 “sexo” x 2 “genotipo” x 2 “tratamiento”” nos muestran que globalmente los animales 3xTgAD realizan menos actividad exploratoria que los NTg (efecto “genotipo”: $F_{1,67}=23.47$, $P\leq 0.001$), observándose este efecto principalmente en machos (efecto “sexo x genotipo”: $F_{1,67}=12.81$, $P\leq 0.001$). Asimismo, también encontramos un efecto “genotipo x tratamiento” ($F_{1,67}=4.06$, $P<0.05$) que nos indica que el tratamiento produce un efecto de incremento de la actividad en animales 3xTgAD, mientras que en NTg la mantiene por debajo de los no tratados.

5.2.1.3. Conducta en la Caja blanca-y-negra

La Figura 5.18 muestra la conducta en la DLB de los 8 grupos experimentales de 12 meses de edad, machos y hembras, NTg y 3xTgAD, sin enriquecimiento (control) y con EA.

Si observamos la “latencia de entrada al compartimento blanco” de los 4 grupos de machos (A) y hembras (B), el ANOVA de los resultados señala que los ratones 3xTgAD muestran mayores “latencias de entrada al compartimento blanco” (el que causa mayor aversión a los animales) que los NTg (ANOVA “2 “sexo” x 2 “genotipo” x 2 “tratamiento”, efecto “genotipo”: $F_{1,67}=8.65$, $P<0.005$). Si bien, en el caso de las hembras esta diferencia entre genotipos no llega a ser estadísticamente significativa (Fig. 5.18.B; ANOVA “2 “genotipo” x 2 “tratamiento””, efecto “genotipo”: $F_{1,35}=2.37$, *n.s.*), en los machos sí que llega a la significación estadística (Fig. 5.18.A; ANOVA “2 “genotipo” x 2 “tratamiento””, efecto “genotipo”: $F_{1,32}=7.08$, $P<0.05$), indicando que probablemente los animales 3xTgAD presenten mayores niveles de ansiedad/temerosidad que los NTg.

La Figura C-D muestra el “tiempo transcurrido en el compartimento blanco” de la Caja blanca-y-negra , por los 4 grupos de machos (C) y hembras (D). En concordancia con los resultados de la “latencia de entrada al compartimento blanco”, el ANOVA “2 “sexo” x 2 “genotipo” x 2 “tratamiento”” de los resultados indica que los ratones transgénicos pasan menos tiempo en el compartimento blanco que los NTg (ANOVA efecto “genotipo”: $F_{1,67}=9.49$, $P<0.005$), posiblemente indicando una mayor ansiedad/temerosidad en los animales 3xTgAD. En línea con lo anterior, este efecto es evidente en machos (Fig. 5.18.C, ANOVA “2 “genotipo” x 2 “tratamiento””, efecto “genotipo”: $F_{1,32}=18.25$, $P<0.001$) pero no en hembras (Fig. 5.18.D, ANOVA “2 “genotipo” x 2 “tratamiento””, efecto “genotipo”: $F_{1,35}=0.08$, *n.s.*). Así, los resultados del ANOVA “2 “sexo” x 2 “genotipo” x 2 “tratamiento”” muestran dicha diferencia del genotipo en función del sexo (efecto “genotipo x sexo”: $F_{1,67}=7.16$, $P<0.05$).

En cuanto a los efectos del enriquecimiento ambiental, si analizamos ambos sexos conjuntamente, el ANOVA de los resultados muestra que los animales con EA pasan menos “tiempo en el compartimento blanco” que los no tratados (efecto “tratamiento”: $F_{1,67}=3.95$, $P\leq 0.05$), hecho que se hace evidente especialmente en las hembras (Fig. 5.18.D; ANOVA “2 “genotipo” x 2 “tratamiento””, efecto “tratamiento”: $F_{1,35}=4.38$, $P<0.05$).

La Fig. 5.18.E-F muestra el número de entradas al compartimento blanco de la caja blanca/negra que realizan los sujetos. En concordancia con los resultados anteriores, el ANOVA global muestra que los animales 3xTgAD realizan un menor “número de entradas al compartimento blanco” que los ratones NTg (ANOVA “2 “sexo” x 2 “genotipo” x 2 “tratamiento””, efecto “genotipo”: $F_{1,67}=12.83$, $P\leq 0.001$). Asimismo, también se puede observar que existe una diferencia en el efecto del genotipo en función del sexo (ANOVA efecto “genotipo x sexo”: $F_{1,67}=7.17$, $P<0.05$), de modo que en el caso de los machos (E) el número de entradas al compartimento blanco del grupo 3xTgAD es significativamente inferior que en los NTg (ANOVA “2 “genotipo” x 2

“tratamiento”, efecto “genotipo”: $F_{1,32}=18.20, P<0.001$), mientras esto no ocurre entre las hembras (F)(ANOVA efecto “genotipo”: $F_{1,35}=0.44, P=0.51$). Por otro lado, también se midió el “número de entradas de medio cuerpo en el compartimento blanco” (datos no representados aquí) que realizan los animales. En esta variable sí que existe una diferencia significativa entre los ratones 3xTgAD y los NTg en hembras (media \pm error estándar: 3xTgAD= 0.35 ± 0.15 , NTg = 1.18 ± 0.20 ; ANOVA efecto “genotipo”: $F_{1,35}=9.06, P\leq 0.005$) al igual que en machos (media \pm error estándar: 3xTgAD = 0.58 ± 0.14 , NTg = 1.47 ± 0.3 ; ANOVA efecto “genotipo”: $F_{1,32}=7.5, P=0.01$).

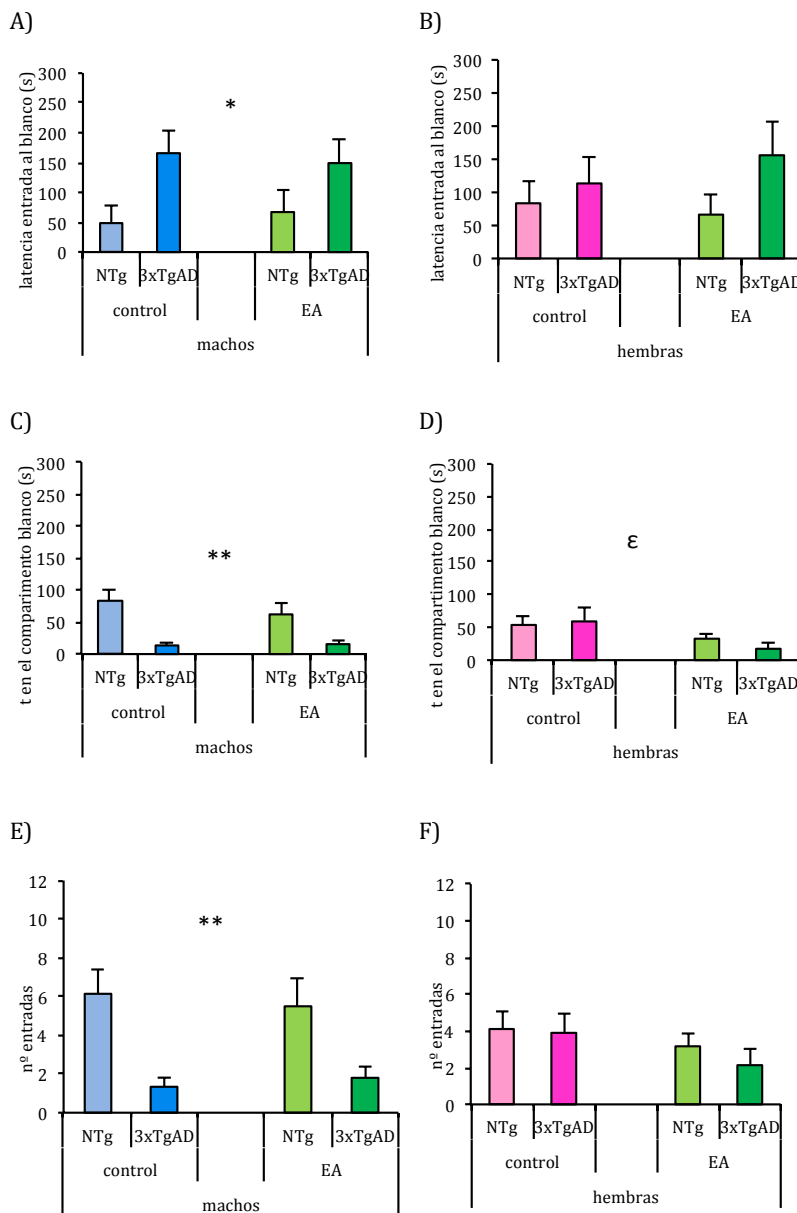


Figura 5.18.- Latencia de entrada (A-B), tiempo de permanencia (C-D) y número total de entradas (E-F) en el compartimento blanco de la Caja blanca-y-negra, de machos y hembras, NTg y 3xTgAD, no tratados (controles) y enriquecidos (EA), de 12 meses de edad (n=7-12 por grupo). Los resultados se representan como media \pm error estándar. ** $P < 0.001$ y * $P < 0.05$ efecto "genotipo", $\epsilon P < 0.05$ efecto "tratamiento".

Otra de las variables conductuales que refleja el nivel de ansiedad/temerosidad de los animales es el “número de defecaciones”. En la Figura 5.19. se ilustra el “número de defecaciones” depositado por machos (izquierda de la Figura) y hembras (derecha de la Figura) NTg y triple transgénicos, no tratados y con EA, de 12 meses de edad, en la Caja blanca-y-negra. Al analizar los datos de ambos sexos conjuntamente, los resultados del ANOVA “2 “sexo” x 2 “genotipo” x 2 “tratamiento”” indican que, en cuanto a las “defecaciones totales” contabilizadas en ambos compartimentos, los ratones 3xTgAD depositan un mayor número que los NTg (ANOVA efecto “genotipo”: $F_{1,67}=7.24, P<0.05$). Este efecto es claro en las hembras (ANOVA “2 “genotipo” x 2 “tratamiento””, efecto “genotipo”: $F_{1,35}=7.05, P<0.05$), mientras que en machos no llega a la significación estadística (ANOVA efecto “genotipo”: $F_{1,32}=1.39, n.s.$).

Por lo que respecta a los efectos del tratamiento de EA, los animales enriquecidos depositan un menor “número de defecaciones” que los ratones sin tratamiento (ANOVA “2 “sexo” x 2 “genotipo” x 2 “tratamiento””, efecto “tratamiento”: $F_{1,67}=7.31, P<0.05$), efecto que se hace especialmente visible en machos (ANOVA “2 “genotipo” x 2 “tratamiento”, efecto “tratamiento”: $F_{1,32}=6.18, P<0.05$).

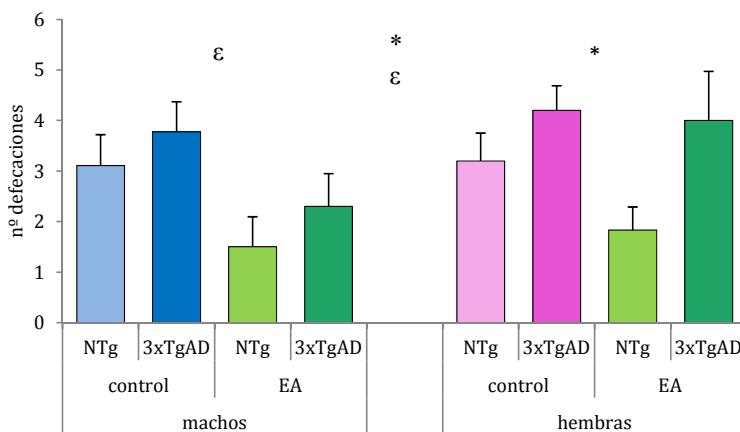


Figura 5.19.- Defecaciones en la Caja blanca-y-negra de machos (izquierda) y hembras (derecha) NTg y 3xTgAD, no tratados (control) y enriquecidos (EA), de 12 meses de edad ($n=7-12$ por grupo). Los resultados se expresan como media \pm error estándar. * $P<0.05$ efecto “genotipo”, $\epsilon P<0.05$ efecto “tratamiento”.

5.2.1.4. Conducta en la Tabla de agujeros

La Figura 5.20. muestra la “latencia de exploración -o latencia de *head-dips*” (A-B), el “número de exploraciones totales” (o “*head dips*”; C-D) y el “tiempo acumulado de exploración” (E-F) en la sesión de 5 minutos de HB, por machos y hembras, NTg y 3xTgAD, no tratados y con EA, de 12 meses de edad.

Los resultados del ANOVA “2 “sexo” x 2 “genotipo” x 2 “tratamiento”” indican que los animales 3xTgAD presentan una mayor “latencia de exploración” del primer agujero, cuando se tienen en cuenta ambos sexos conjuntamente (ANOVA efecto “genotipo”: $F_{1,66}=5,87$, $P\leq 0.05$). Cuando se analizan ambos sexos de manera independiente, solamente en machos 3xTgAD encontramos la misma tendencia, sin llegar a la significación estadística (ANOVA “2 “genotipo” x 2 “tratamiento””, efecto “genotipo” en machos: $F_{1,31}=3.81$, $P=0.06$; en hembras: $F_{1,35}=2.05$, *n.s.*).

El análisis de ambos sexos conjuntamente mediante ANOVA “2 “sexo” x 2 “genotipo” x 2 “tratamiento””, también nos muestra que existen interacciones “genotipo x sexo” para “tiempo acumulado de exploración” ($F_{1,64}=5.29, P<0.05$) y para “número de exploraciones” ($F_{1,66}=4.63, P<0.05$), señalando una diferencia entre genotipos más marcada en machos que en hembras. Así, los machos 3xTgAD realizan un menor “número de exploraciones”, y por tanto pasan menos tiempo explorando que el grupo NTg (ANOVA “2 “genotipo” x 2 “tratamiento””, efecto “genotipo” para “tiempo acumulado de exploración”: $F_{1,29}=4.12, P=0.052$; para “número de exploraciones”: $F_{1,31}=4.28, P<0.05$), mientras que las hembras 3xTgAD no muestran diferencias vs. las NTg (ANOVA “2 “genotipo” x 2 “tratamiento””, efecto “genotipo” para “tiempo acumulado de exploración”: $F_{1,35}=1.25, n.s.$; para “número de exploraciones”: $F_{1,35}=0.51, n.s.$).

En cuanto al “tiempo acumulado de exploración”, el ANOVA de los resultados también señala un efecto “genotipo x tratamiento” ($F_{1,64}=4.77, P<0.05$), indicando que el enriquecimiento aumenta el “tiempo acumulado de exploración” en animales NTg, aunque no muestra el mismo efecto en los ratones 3xTgAD.

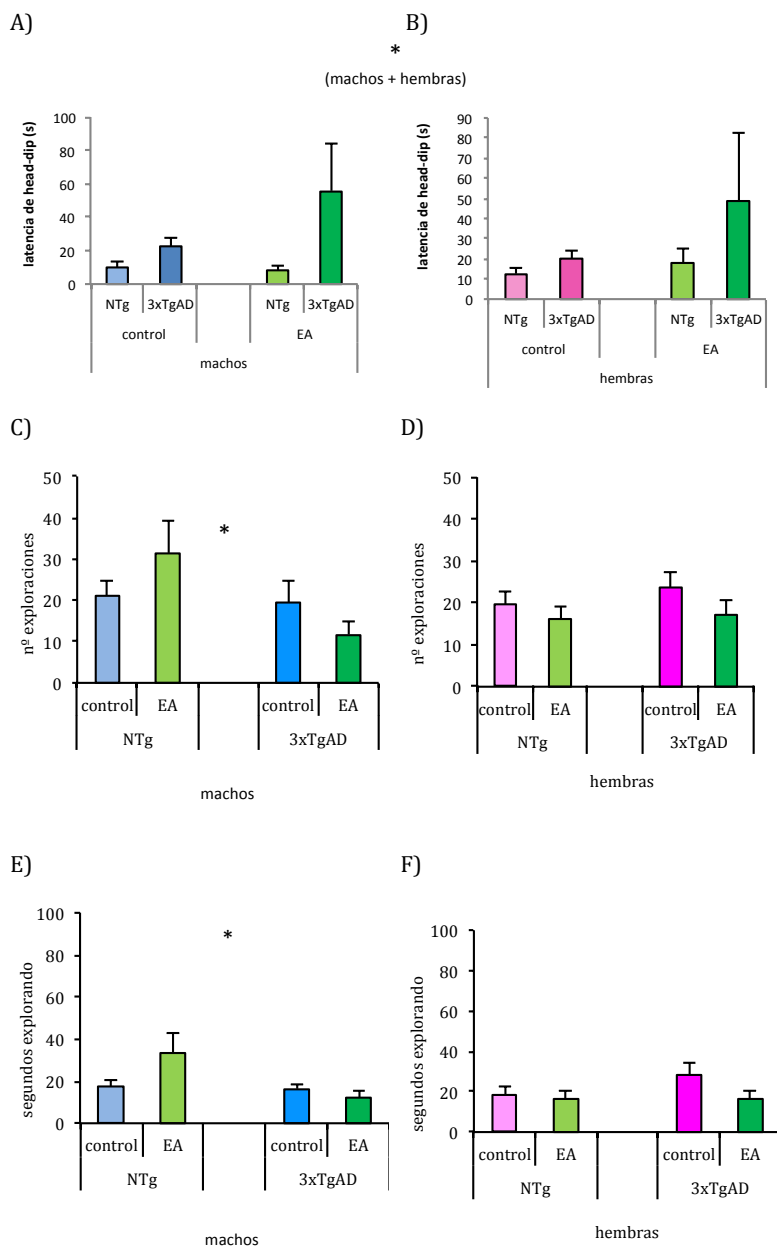


Figura 5.20.- Latencia de exploración (“head dip”; **A-B**), Número de exploraciones (**C-D**) y Tiempo acumulado de exploración (**E-F**) de machos y hembras, NTg y 3xTgAD, no tratados (control) y enriquecidos (EA), de 12 meses de edad, en la Tabla de agujeros ($n=7-12$ por grupo). Los resultados se expresan como media \pm error estándar. $*P<0.05$ efecto “genotipo”.

Como ya hemos comentado en las pruebas anteriores, una variable que refleja ansiedad/temerosidad en los animales es el “número de defecaciones” depositadas. Así en la Figura 5.21. se indican el número de defecaciones de machos (A) y hembras (B) NTg y 3xTgAD, no tratados (control) y enriquecidos (EA), de 12 meses de edad, en la Tabla de agujeros. En concordancia con los resultados de las pruebas anteriores, los resultados del ANOVA “2 “sexo” x 2 “genotipo” x 2 “tratamiento”” indican que los animales 3xTgAD defecan más que los NTg (ANOVA efecto “genotipo”: $F_{1,65}=10.66$, $P<0.005$), diferencia que podemos observar, igualmente, en el análisis de machos y hembras individualmente (ANOVA en machos, efecto “genotipo”: $F_{1,30}=5.56$, $P<0.05$; en hembras, efecto “genotipo”: $F_{1,35}=5.26$, $P<0.05$).

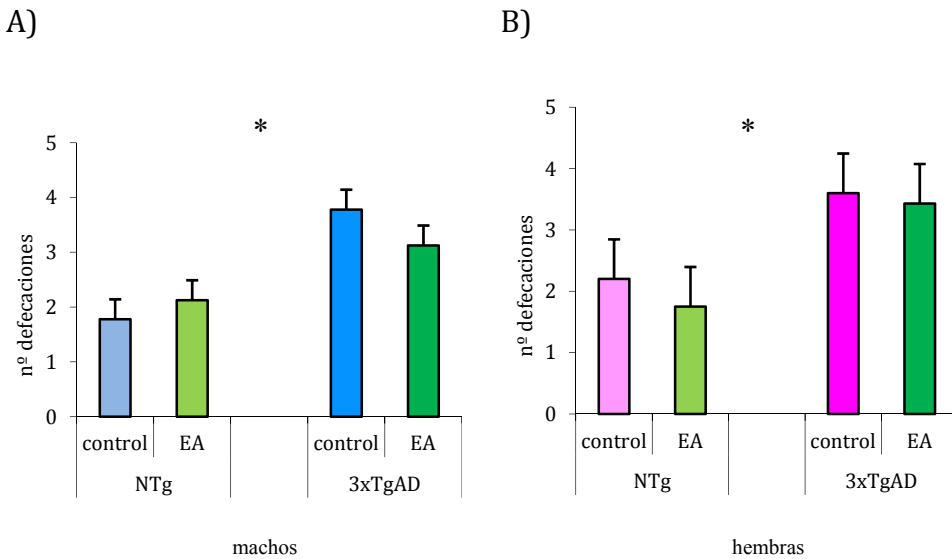


Figura 5.21.- Número de defecaciones de machos (A) y hembras (B) NTg y 3xTgAD, controles y enriquecidos (EA), de 12 meses de edad, en la Tabla de agujeros (n=7-12 por grupo). Los resultados se expresan como media \pm error estándar. * $P<0.05$ efecto “genotipo”.

5.2.1.5. Laberinto acuático de Morris

Tarea de aprendizaje/memoria espacial de referencia (“Place task”)

Para comprobar qué variable sería la de elección y que mejor representase la ejecución/adquisición de los animales en la tarea de aprendizaje espacial de referencia, hemos realizado en primer lugar un análisis de las velocidades medias de natación de los ratones de ambos genotipos. Así, en la Figura 5.22. se muestran los resultados de velocidad media de natación para machos y hembras, de los grupos NTg y 3xTgAD. Los datos muestran, igual que ocurría a los 2.5 y 6 meses de edad (y en otros estudios de nuestro laboratorio), que el grupo 3xTgAD presenta una mayor velocidad de natación que el NTg tanto en machos ($t_{1,16}=2.75$, $P<0.05$) como en hembras ($t_{1,18}=7.29$, $P<0.001$). Por tanto, escogimos la “distancia recorrida”, en lugar de la “latencia de llegada a la plataforma”, como variable de ejecución del aprendizaje.

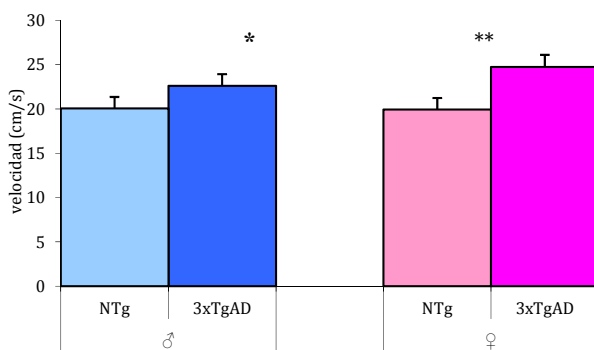


Figura 5.22.- Se representan medias \pm error estándar. Diferencia en la velocidad media de natación entre genotipos a los 12 meses de edad en el Laberinto acuático de Morris ($n=9-10$ por grupo). La velocidad se calculó a partir de los ensayos de la primera tarea, o tarea de aprendizaje espacial de referencia (PT). * $P<0.05$, ** $P<0.001$ entre ambos grupos (t de Student).

En la Figura 5.23. se ilustran los resultados de la tarea de aprendizaje espacial de referencia de los 8 grupos experimentales a los 12 meses de edad, incluyendo ambos genotipos, ambos sexos, controles (no tratados) y tratados con enriquecimiento ambiental. Podemos observar que existe una curva significativa de aprendizaje por parte de los 8 grupos a medida que avanzan los días, hasta llegar todos al mismo nivel de adquisición el día 5 en la tarea de aprendizaje espacial (MANOVA “2 “genotipo” x 2 “sexo” x 2 “tratamiento” x 5 “día”, efecto “día”: $F_{3,68,246.92}=60.08$, $P<0.001$). Además, aparece un efecto “genotipo x tratamiento x día” (MANOVA, $F_{3,68,246.92}=2.78$, $P<0.05$).

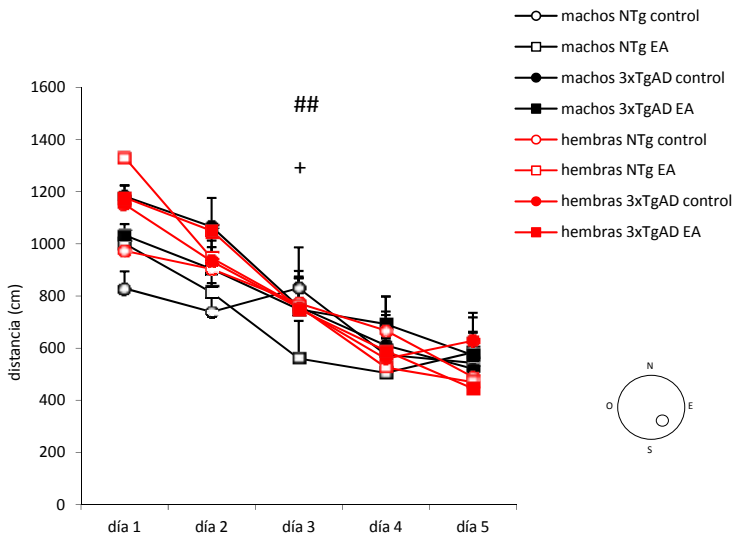


Figura 5.23.- Tarea de aprendizaje espacial de referencia: Curva de distancias recorridas en el Laberinto acuático de Morris por los 8 grupos experimentales, los cuales incluyen los genotipos NTg y 3xTgAD, ambos sexos, controles (no tratados) y tratados con enriquecimiento ambiental, a los 12 meses de edad ($n=7-12$ por grupo). A la derecha se localiza la imagen de la situación de la plataforma durante la tarea. ## $P<0.001$ efecto “día”, + $P<0.05$ efecto “genotipo x tratamiento x día”.

Si se aplica un MANOVA a los 2 primeros días de adquisición (Fig. 5.23.), para empezar a desglosar esa triple interacción, se observan efectos del genotipo (MANOVA: $F_{1,67}=9.59$, $P<0.005$; globalmente los ratones 3xTgAD presentan peor adquisición), del sexo (MANOVA: $F_{1,67}=8.41$, $P\leq 0.005$; globalmente las hembras son peores que los machos), de “genotipo x tratamiento” (MANOVA: $F_{1,67}=6.95$, $P<0.05$; el efecto del tratamiento es positivo y mayor en los animales transgénicos, especialmente en machos) y de “genotipo x sexo” (MANOVA: $F_{1,67}=4.29$, $P<0.05$).

Para ilustrar con mayor claridad los efectos principales del genotipo y del sexo mencionados, presentamos los mismos en la Figura 5.24. Así, la Figura 5.24.A ilustra el efecto del genotipo sólo en animales no tratados. La Figura 5.24.B ilustra el efecto “genotipo” global (del MANOVA anterior; ver Fig. 5.23.) sobre la media de los dos primeros días de adquisición. Y la Figura 5.24.C representa el efecto “sexo” global (del MANOVA anterior; ver Fig. 5.23.) sobre los dos primeros días de adquisición. Se observa como los ratones 3xTgAD adquieren peor la tarea de aprendizaje espacial en el MWM que los NTg, y que este efecto se concentra especialmente en los dos primeros días de entrenamiento, como ilustran las Fig. 5.23. y 5.24.B. Por otro lado, el efecto “sexo” del MANOVA anterior se observa en la Fig. 5.24.C, en el sentido de que, globalmente, los machos realizan menor distancia media que las hembras, durante los primeros 2 días de entrenamiento.

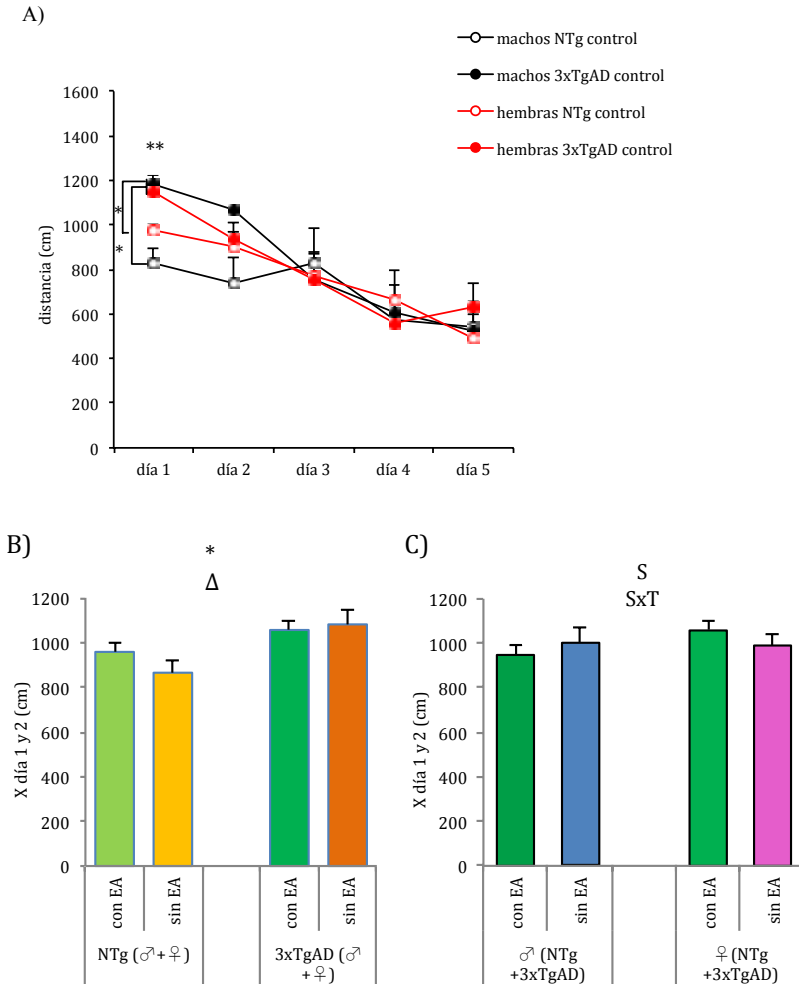


Figura 5.24.- Tarea de aprendizaje espacial de referencia (“Place task”) en el MWM: **A)** Curva de aprendizaje de machos y hembras de ambos genotipos NTg y 3xTgAD ($n=9-10$ por grupo). **B)** Media de las distancias recorridas los días 1 y 2, en la “Place task” por los 2 grupos de animales NTg y los 2 grupos de ratones 3xTgAD, con ambos tratamientos (EA y controles). Ambos genotipos incluyen los individuos de los dos sexos. **C)** Media de las distancias recorridas los días 1 y 2, en la “Place task” por los 2 grupos de machos y los 2 grupos hembras, con ambos tratamientos. Ambos sexos incluyen los individuos de los dos genotipos. Grupo con EA: $n=15-16$; grupo sin EA: $n=18-20$ por grupo. Los resultados se expresan como media \pm error estándar. * $P<0.05$ y ** $P<0.001$ efecto “genotipo”, Δ $P<0.05$ efecto “genotipo x tratamiento”, S $P<0.05$ efecto “sexo”, SxT efecto “sexo x tratamiento” $P=0.08$. En “A)” Prueba post hoc de Duncan en los resultados del día 1 (tras “two-way” ANOVA).

Para observar mejor los efectos “genotipo” y “sexo” descritos por el MANOVA comentado anteriormente, realizamos un ANOVA con la media de las distancias recorridas los 2 primeros días de “Place task”. Así, cuando desglosamos dicho efecto, observamos que las hembras realizan peor la tarea de aprendizaje durante los 2 primeros días de MWM que los machos (ver Figura 5.24.C, ANOVA “2 “sexo” x 2 “tratamiento””, efecto “sexo”: $F_{1,71}=6.88$, $P<0.05$), observándose, además, una tendencia del EA a disminuir las distancias recorridas en machos (ANOVA efecto “sexo x tratamiento”: $F_{1,71}=3.16$, $P=0.08$). Asimismo, del mismo modo que sucedía con los resultados del MANOVA comentado (de la Fig. 5.23), cuando analizamos los datos de ambos genotipos, el ANOVA “2 “genotipo” x 2 “tratamiento”” muestra que los ratones 3xTgAD realizan peor la tarea de aprendizaje espacial los 2 primeros días de PT que el grupo NTg (ANOVA efecto “genotipo”: $F_{1,71}=5.56$, $P<0.05$), mientras que el EA disminuye las distancias recorridas especialmente en el grupo 3xTgAD (ANOVA efecto “genotipo x tratamiento”: $F_{1,71}=7.79$, $P<0.05$).

Pensamos que, aunque las interacciones (“genotipo x tratamiento” y “genotipo x sexo”) que muestra el MANOVA aparecen sólo considerando los 2 primeros días, esto es motivo suficiente como para que sea deseable desglosar los efectos (con objeto de estudiarlos en más detalle) evaluando también ambos sexos por separado.

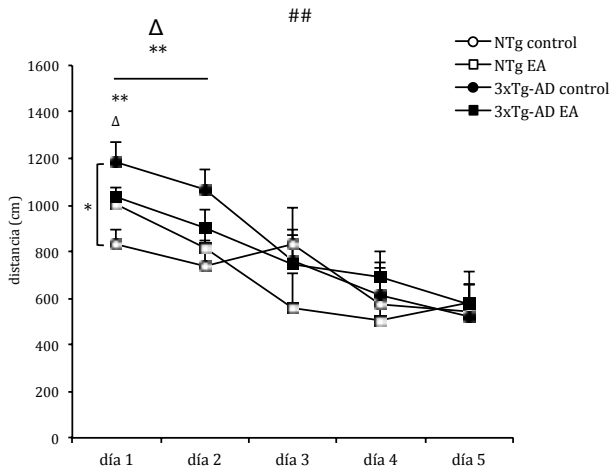
Tarea de aprendizaje/memoria espacial en machos

El MANOVA (“2 “genotipo” x 2 “tratamiento” x 5 “día””) aplicado a los resultados de los 5 días de adquisición en los machos, que se presentan en la Figura 5.25.A, indica un efecto del “día” ($F_{3,68,117.66}=18.85$, $P<0.001$). Siguiendo la lógica descrita arriba, hemos realizado un MANOVA de los 2 primeros días de entrenamiento, que muestra efectos significativos del “día” ($F_{1,32}=6.55$, $P<0.05$) y del “genotipo” ($F_{1,32}=10.77$, $P<0.005$), indicativo este último de que los ratones 3xTgAD presentan una adquisición empeorada durante esos 2

primeros días, así como un efecto “genotipo x tratamiento” ($F_{1,32}=5.23, P<0.05$; mostrando un efecto del EA de mejora del aprendizaje en los ratones 3xTgAD). En especial, los machos 3xTgAD muestran peor adquisición de la tarea de aprendizaje espacial que el grupo NTg en el día 1 (ANOVA, efecto “genotipo”: $F_{1,32}=9.36, P<0.05$; ver prueba de Duncan en Fig. 5.25.A). Se observa también que el tratamiento de EA mejora la adquisición en el grupo 3xTgAD, y la empeora en el grupo NTg, el día 1 de la tarea, lo que da lugar a una interacción “genotipo x tratamiento” significativa (ANOVA, $F_{1,32}=6.53, P<0.05$). Tales efectos del EA quedan también reflejados en el hecho de que los dos grupos no tratados (NTg y 3xTgAD) difieren entre sí el día 1, mientras que el grupo transgénico tratado (3xTgAD-EA) no difiere de ninguno de los dos grupos no transgénicos (ver prueba *post-hoc* de Duncan en la Fig. 5.25.A).

En la Figura 5.25.B se muestran los resultados de las distancias recorridas por los 4 grupos de machos de 12 meses, desglosados ensayo por ensayo. El MANOVA aplicado a los resultados de los 4 ensayos, día por día individualmente, indica que existe un efecto “ensayo” (día 1: $F_{2,82,90.17}=8.14, P<0.001$; día 2: $F_{3,96}=7.72, P<0.001$; y día 3: $F_{2,86,91.47}=7.02, P<0.001$), dado que los 4 grupos muestran un aprendizaje progresivo hasta que la curva de aprendizaje se hace asintótica en el día 4 y 5. El grupo 3xTgAD realiza peor la tarea de aprendizaje que los NTg el día 1 (MANOVA, efecto “genotipo”: $F_{1,32}=9.36, P<0.005$) y día 2 (MANOVA, efecto “genotipo”: $F_{1,32}=4.96, P<0.05$), como ya se observaba en la Figura anterior (ver Fig. 5.25.A). El día 1, los animales 3xTgAD con EA muestran una mejora del aprendizaje respecto al grupo 3xTgAD no tratado en determinados ensayos (MANOVA, efecto “genotipo x tratamiento x ensayo”: $F_{2,82,90.17}=3.70, P<0.05$), así como en determinados ensayos del día 2 (ANOVA, efecto “genotipo x tratamiento x ensayo”: $F_{3,96}=3.66, P<0.05$), mientras que esta mejoría en la tarea de aprendizaje no se produce en los NTg (MANOVA, efecto “genotipo x tratamiento”: $F_{1,32}=6.53, P<0.05$).

A)



B)

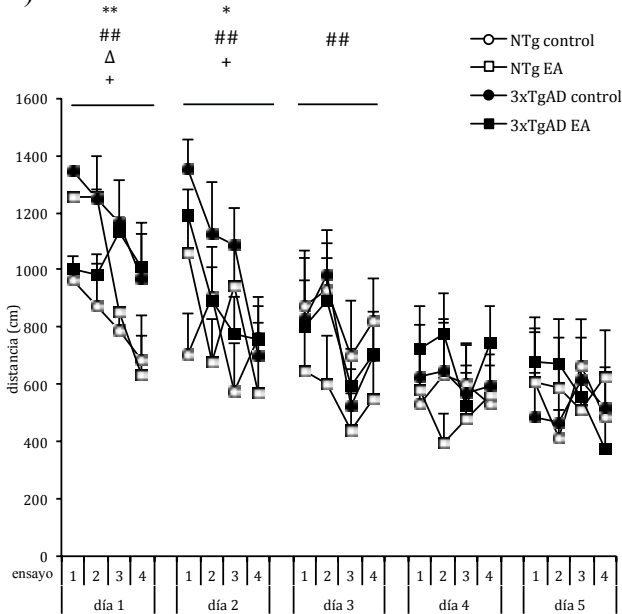
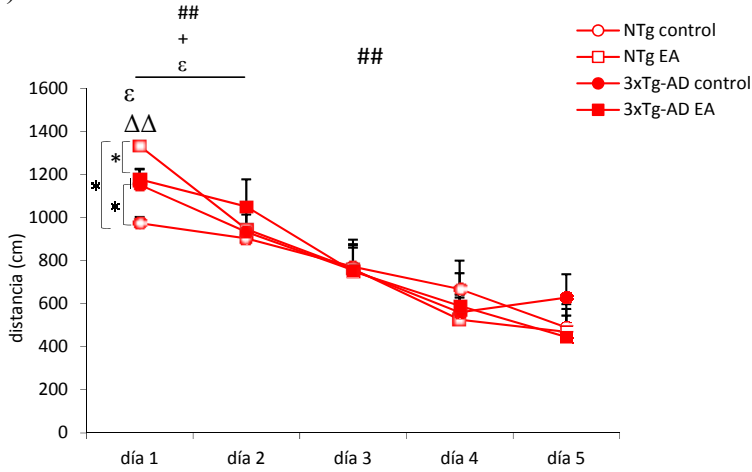


Figura 5.25.- Tarea de adquisición en el MWM: **A)** medias diarias, **B)** ensayo por ensayo. Efecto del enriquecimiento ambiental sobre ambos grupos de machos ($n=8-10$ por grupo). Los resultados se expresan como media \pm error estándar. En "A)" Prueba post-hoc de Duncan en los resultados del día 1. ## $P<0.001$ efecto "día"/"ensayo", * $P<0.05$ y ** $P<0.001$ efecto "genotipo", Δ $P<0.05$ efecto "genotipo x tratamiento", + $P<0.05$ efecto "genotipo x tratamiento x ensayo".

Tarea de aprendizaje/memoria espacial en hembras

En el caso de las hembras (Fig. 5.26), cuando se analizan las distancias medias diarias recorridas por los grupos de NTg y 3xTgAD de 12 meses de edad, controles y enriquecidas para ambos genotipos, a lo largo de los 5 días (Fig. 5.26.A), los resultados del MANOVA (“2 “genotipo” x 2 “tratamiento” x 5 “día””) indican que existe aprendizaje por parte de los 4 grupos a lo largo del entrenamiento (efecto “día”: $F_{3,76,131.70}=45.39$, $P<0.001$), que se hace asintótico en el día 5 (Fig. 5.26.A). Tomando como referencia los análisis realizados en el caso de los machos, si se realiza un MANOVA de los dos primeros días de entrenamiento, los resultados muestran que además del aprendizaje por parte de los 4 grupos (efecto “día”: $F_{1,35}=16.34$, $P<0.001$), existe un efecto “genotipo x tratamiento x día” ($F_{1,35}=4.20$, $P<0.05$). Paradójicamente, el efecto del tratamiento va en la dirección contraria al observado en machos (ver Fig. 5.25.A), pues las hembras de ambos genotipos con EA muestran mayores distancias recorridas durante los dos primeros días (efecto “tratamiento”: $F_{1,35}=7.79$, $P<0.05$; Fig. 5.26.A). Cuando se analizan las distancias medias recorridas por los 4 grupos durante el primer día, los resultados del ANOVA muestran, de nuevo, una peor ejecución de la tarea de las hembras enriquecidas (efecto del “tratamiento”: $F_{1,35}=18.31$, $P<0.001$), debido en esencia al efecto que el EA induce en las hembras NTg (efecto “genotipo x tratamiento”: $F_{1,35}=13.76$, $P\leq 0.001$, prueba *post-hoc* de Duncan en Fig. 5.26.A).

A)



B)

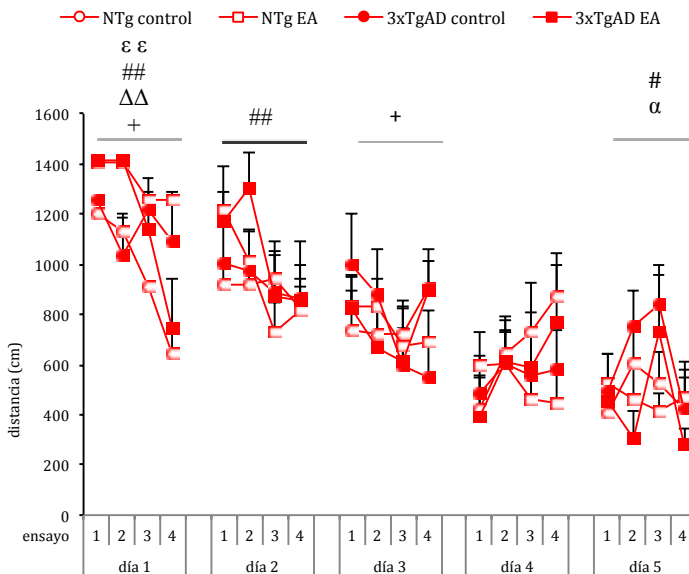


Figura 5.26.- Tarea de aprendizaje espacial de referencia en el MWM, **A)** medias diarias, **B)** ensayo por ensayo. Efecto del enriquecimiento ambiental sobre ambos genotipos ($n=7-12$ por grupo). Los resultados se expresan como media \pm error estándar. ## $P<0.001$ efecto "día"/"ensayo", ϵ $P<0.05$ y $\epsilon\epsilon$ $P<0.001$ efecto "tratamiento", + $P<0.05$ efecto "genotipo x tratamiento x día", $\Delta\Delta$ $P<0.001$ efecto "genotipo x tratamiento", + $P<0.05$ y ++ $P<0.001$ efecto "genotipo x tratamiento x ensayo", α $P<0.05$ efecto "genotipo x ensayo". En "A)" Prueba post-hoc de Duncan en los resultados del día 1 (tras "two-way" ANOVA), * $P<0.05$ diferencia entre grupos.

Cuando se analizan más detalladamente, ensayo por ensayo, los resultados de la curva de aprendizaje de las hembras a lo largo de los 5 días, el MANOVA indica una mejora de la ejecución de la tarea a lo largo de los 4 ensayos diarios los días 1, 2 y 4 (efecto “ensayo”: $F_{2.34,81.84}=15.99, P<0.001$; $F_{3,105}=4.05, P<0.05$; $F_{2.84,99.40}=4.32, P<0.05$, respectivamente; ver Fig. 5.26.B). El MANOVA de los resultados de las distancias recorridas el día 1 confirma lo observado en los análisis de las distancias medias por día (ver Fig. 5.26.A), pues muestra el efecto del enriquecimiento contrario al esperado (MANOVA efecto “tratamiento”: $F_{1,35}=18.31, P<0.001$), donde las hembras enriquecidas de ambos genotipos recorren mayores distancias que las no tratadas. Aparecen además, efectos “genotipo x tratamiento” en el día 1 (MANOVA: $F_{1,35}=13.76, P\leq 0.001$), efecto “genotipo x tratamiento x ensayo” el día 1 y 3 (MANOVA: $F_{2.34,81.84}=7.99, P<0.001$; $F_{3,105}=2.98, P<0.05$, respectivamente) y efecto “genotipo x ensayo” el día 5 (MANOVA: $F_{2.84,99.40}=3.79, P<0.05$). En conjunto, las interacciones mencionadas no ofrecen un patrón sistemático de efectos del tratamiento.

Sesión de memoria sin plataforma a la 1h30

En la siguiente Tabla se indican las variables obtenidas en la Prueba de memoria sin plataforma (“*Probe test*” o “*Removal 1h30*”) a la 1h30 de la PT, de machos y hembras NTg y 3xTgAD, controles y enriquecidas (EA) de 12 meses de edad. Las variables obtenidas fueron: la distancia recorrida hasta realizar el primer cruce del anillo (“a.c.”, del inglés “*annulus crossings*”), el “número total de a.c.” en el cuadrante P (donde se encontraba la plataforma en la tarea anterior de aprendizaje espacial de referencia), la preferencia de cada uno de los 4 grupos por el cuadrante P (obtenida a partir del “porcentaje de distancia recorrida en el cuadrante P respecto a la distancia total” recorrida en los 4 cuadrantes) y, por último, la “velocidad media de natación”. De este modo, los

resultados de los ANOVAs globales (2 “sexo” x 2 “genotipo” x 2 “tratamiento”) realizados para cada una de las variables muestran que no existen diferencias estadísticamente significativas entre grupos (todas las $F \leq 3.71$, $P > 0.06$; Tabla 5.5.). En cuanto a la velocidad de natación, en MANOVA “2 “sexo” x 2 “genotipo” x 2 “tratamiento” nos indica que las hembras son más rápidas que los machos ($F_{1,66} = 8.82$; $P < 0.005$).

	machos			
	NTg		3xTgAD	
	controles n=9	EA n=8	controles n=6-9	EA n=7-10
distancia recorrida hasta el 1r a.c.	508,75 ± 130,47	418,62 ± 135,90	406,70 ± 130,58	425,79 ± 137,21
n° total de a.c. en el cuadrante P	3,56 ± 0,69	4,00 ± 1,02	4,11 ± 0,79	4,00 ± 0,90
% distancia recorrida en P respecto al total	32,38 ± 4,40	37,27 ± 5,35	36,39 ± 5,78	42,83 ± 5,84
velocidad de natación	20,45 ± 1,08	19,29 ± 0,84	21,11 ± 1,73	19,73 ± 1,61

	hembras			
	NTg		3xTgAD	
	controles n=11	EA n=12	controles n=8-9	EA n=6-7
distancia recorrida hasta el 1r a.c.	238,14 ± 43,32	358,46 ± 110,99	463,58 ± 104,81	295,23 ± 56,16
n° total de a.c. en el cuadrante P	3,73 ± 0,67	4,08 ± 0,70	3,00 ± 0,62	4,57 ± 0,48
% distancia recorrida en P respecto al total	39,62 ± 3,94	28,91 ± 3,29	36,17 ± 3,42	38,96 ± 3,69
velocidad de natación	20,38 ± 1,11	23,16 ± 0,53	24,08 ± 1,62	23,84 ± 1,62

Tabla 5.5.- Sesión de memoria sin plataforma en el MWM de machos y hembras de 12 meses de edad. Los resultados se representan como media ± error estándar. Todos los resultados de los ANOVA de las variables nombradas en la tabla anterior son estadísticamente n.s.

Prueba de “emparejamiento retardado -15s- a una posición” (“15s -*Delayed matching-to-place*”, DMP-15s)

La Figura 5.27 muestra los resultados obtenidos al calcular la diferencia entre la distancia media recorrida (media de los 4 días) en el primer ensayo de la tarea de “15s-*Delayed matching-to-place*” (DMP-15s) y la distancia media recorrida en el segundo ensayo (media de los 4 días) realizado 15 segundos después. La Figura 5.27 representa los resultados de machos (a la izquierda de la gráfica) y hembras (a la derecha de la gráfica), entendida como “memoria de trabajo” al haber transcurrido sólo 15s entre los 2 ensayos, y mostrando para cada sexo las diferencias entre los dos genotipos (NTg y 3xTgAD) y los 2 tratamientos (tratados con EA y control). De este modo, los resultados del análisis de los dos sexos conjuntamente, indican que existe un efecto significativo del enriquecimiento ambiental, en el sentido de que incrementa la diferencia de distancias medias recorridas entre los “primeros” y “segundos” ensayos de las 4 pruebas de DMP-15s (ANOVA efecto “tratamiento”: $F_{1,66}=4.01$, $P<0.05$, prueba *post-hoc* de Duncan), es decir, el tratamiento con EA parece incrementar la memoria de trabajo.

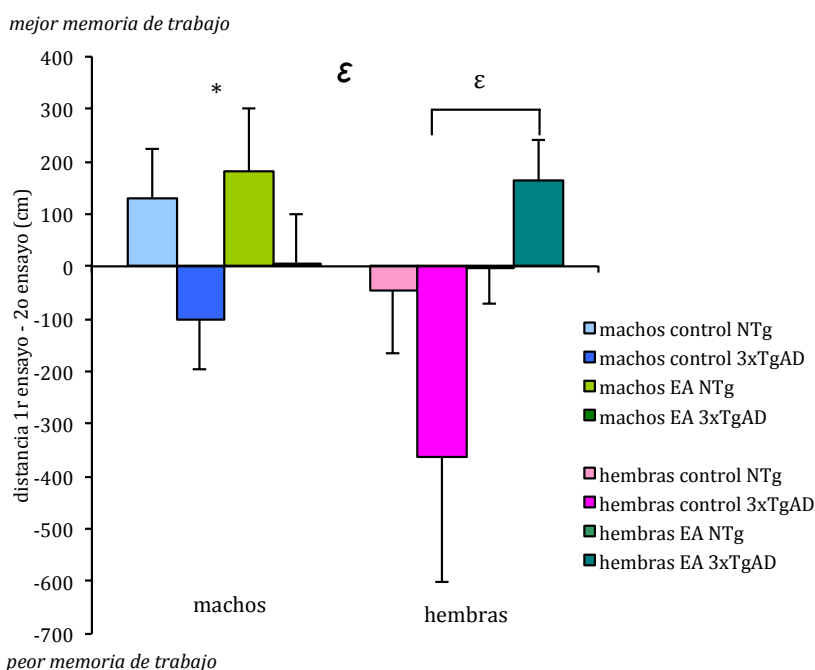


Figura 5.27.- Diferencia entre la distancia media (obtenida a partir de los 4 días) recorrida en el 1er ensayo de la tarea de 15s de “Delayed matching-to-place” y la distancia media recorrida en el 2o ensayo 15s después (n=7-12 por grupo). Los resultados se expresan como media \pm error estándar. * $P < 0.05$, efecto “genotipo” en machos, $\epsilon P < 0.05$ efecto “tratamiento” global en machos y hembras, y prueba post-hoc de Duncan en hembras $P < 0.05$.

Si analizamos la diferencia entre la media de primeros ensayos y segundos ensayos (ambas obtenidas a partir de los 4 días de entrenamiento), para los 4 grupos de machos de 12 meses (NTg controles y enriquecidos, y 3xTgAD controles y enriquecidos) en la tarea de DMP-15s, observamos que los ratones NTg muestran una mayor diferencia de distancias entre los 2 ensayos que los 3xTgAD (ANOVA efecto “genotipo”: $F_{1,31}=4.22$, $P < 0.05$; Fig. 5.27. izquierda). Esto se traduce en que los animales NTg presentan una mejor memoria de trabajo a los 12 meses de edad que los 3xTgAD.

Cuando analizamos las distancias medias diarias (medias obtenidas a partir de los 2 ensayos diarios) recorridas a lo largo de los 4 días en la tarea DMP-15s, por machos y hembras conjuntamente (Fig. 5.28), los resultados del MANOVA indican que existe una diferencia en la ejecución de esta tarea en función del sexo (efecto “sexo”: $F_{1,66}=6.51$, $P<0.05$; Fig. 5.28). La curva de aprendizaje de los machos no tratados con EA, tanto NTg como 3xTgAD, muestra que las distancias recorridas por los individuos son menores que las de las hembras no tratadas con EA, a lo largo de los 4 días. Además, en el caso de los machos la curva de ejecución de la tarea se mantiene más o menos estable a lo largo de los 4 días de entrenamiento, mientras que la de las hembras indica una peor ejecución de la tarea el segundo día con una evolución más pronunciada hasta llegar al cuarto día, en que las distancias recorridas se igualan a las de los machos. Así, el MANOVA de los resultados de ambos sexos nos muestra la evolución del aprendizaje a lo largo de los 4 días comentada anteriormente (efecto “día”: $F_{3,198}=7.51$, $P<0.001$). Los resultados del análisis indican así mismo, que el tratamiento produce un efecto sobre el genotipo que difiere según el sexo (MANOVA efecto “genotipo x tratamiento x sexo” $F_{1,66}=6.64$, $P<0.05$), el cual comentaremos más adelante. De este modo, a continuación serán analizados los resultados de machos y hembras de manera independiente.

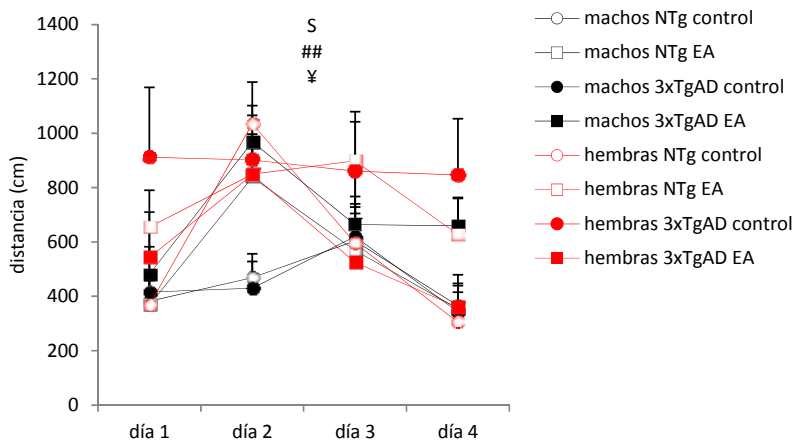
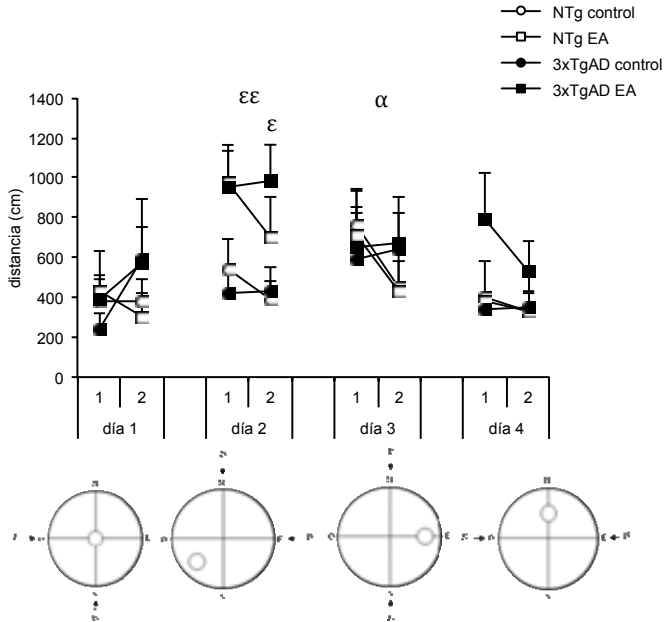


Figura 5.28.- Distancia media recorrida diariamente en la tarea de “Delayed matching-to-place” por machos y hembras, NTg y 3xTgAD, controles y con EA, de 12 meses de edad. Para conocer la localización diaria de la plataforma ver Fig. 5.29.A. Los resultados se expresan como media \pm error estándar. S $P < 0.05$ efecto “sexo”, ## $P < 0.001$ efecto “día”, ¥ $P < 0.05$ efecto “genotipo x tratamiento x sexo”.

Prueba de DMP-15s en machos

La Figura 5.29. muestra las distancias recorridas ensayo por ensayo a lo largo de los 4 días de tarea DMP-15s (Fig. 5.29.A), y distancias medias (obtenidas a partir de los 4 días de test) recorridas en el primer y segundo ensayo (Fig. 5.29.B), por machos de 12 meses de edad. Tal y como observamos en la Fig. 5.29.B, el MANOVA de los resultados indica que los machos NTg muestran una mejor memoria de trabajo que los machos 3xTgAD, al disminuir la distancia recorrida en el 2º ensayo respecto al 1º (efecto “genotipo x ensayo”: $F_{1,31}=4.22$, $P < 0.05$). En apoyo de lo anterior, el ANOVA de las distancias recorridas en el 2º ensayo también muestra una tendencia clara a que los ratones NTg presenten trayectorias más cortas que los 3xTgAD (ANOVA 2º ensayo, efecto “genotipo”: $F_{1,31}=3.97$, $P=0.055$).

A)



B)

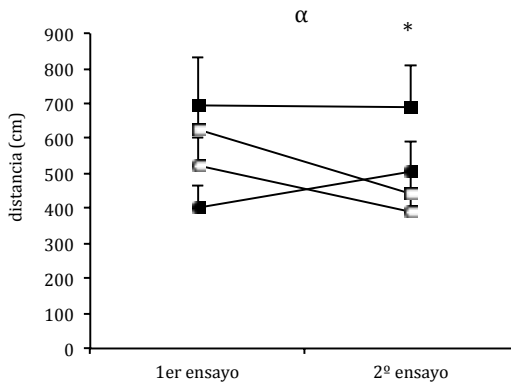


Figura 5.29.- Distancias medias recorridas ensayo por ensayo en los 4 días de entrenamiento (A), y distancias medias (de los 4 días) recorridas en el 1er y 2º ensayo (B), 15s más tarde, por machos de 12 meses, en la tarea de DMP-15s (n=8-10 por grupo). En la parte inferior de (A) se indica la localización de la plataforma y el punto de entrada de los animales en la tarea. Los resultados se representan como media \pm error estándar. * P=0.055 efecto "genotipo"; ϵ P \leq 0.05, $\epsilon\epsilon$ P \leq 0.005 efecto "tratamiento"; α P \leq 0.05 "genotipo x ensayo".

Prueba de DMP-15s en hembras

En la Figura 5.30. analizamos las distancias medias recorridas ensayo por ensayo a lo largo de los 4 días de entrenamiento (Fig. 5.30.A) y las distancias medias (obtenidas a partir de los 4 días de test) recorridas en el primer y segundo ensayo (Fig. 5.30.B), por hembras de 12 meses de edad NTg y 3xTgAD. Tal y como se muestra en la Fig. 5.30.B, el análisis de los resultados indica que el tratamiento de enriquecimiento mejora la memoria de trabajo de las hembras 3xTgAD, a diferencia de las NTg, en las que el grupo con EA recorre más distancia en busca de la plataforma sumergida que su homólogo sin tratamiento (MANOVA efecto “genotipo x tratamiento”: $F_{1,35}=6.58$, $P<0.05$). Asimismo, se observa una tendencia a mejorar la memoria de trabajo por parte de todos los grupos excepto por las hembras 3xTgAD no enriquecidas, que empeoran de un ensayo a otro, sin llegar a ser esta tendencia significativa (MANOVA efecto “tratamiento x ensayo”: $F_{1,35}=3.68$, $P=0.06$). Cuando analizamos el 2º ensayo de manera independiente, los resultados del ANOVA nos muestran de nuevo este efecto del EA de mejora de la memoria de trabajo en el caso de las hembras 3xTgAD (ANOVA “2º ensayo”, efecto “genotipo x tratamiento”: $F_{1,35}=10.39$, $P<0.005$, ver prueba *post-hoc* de Duncan en Fig. 5.30.B).

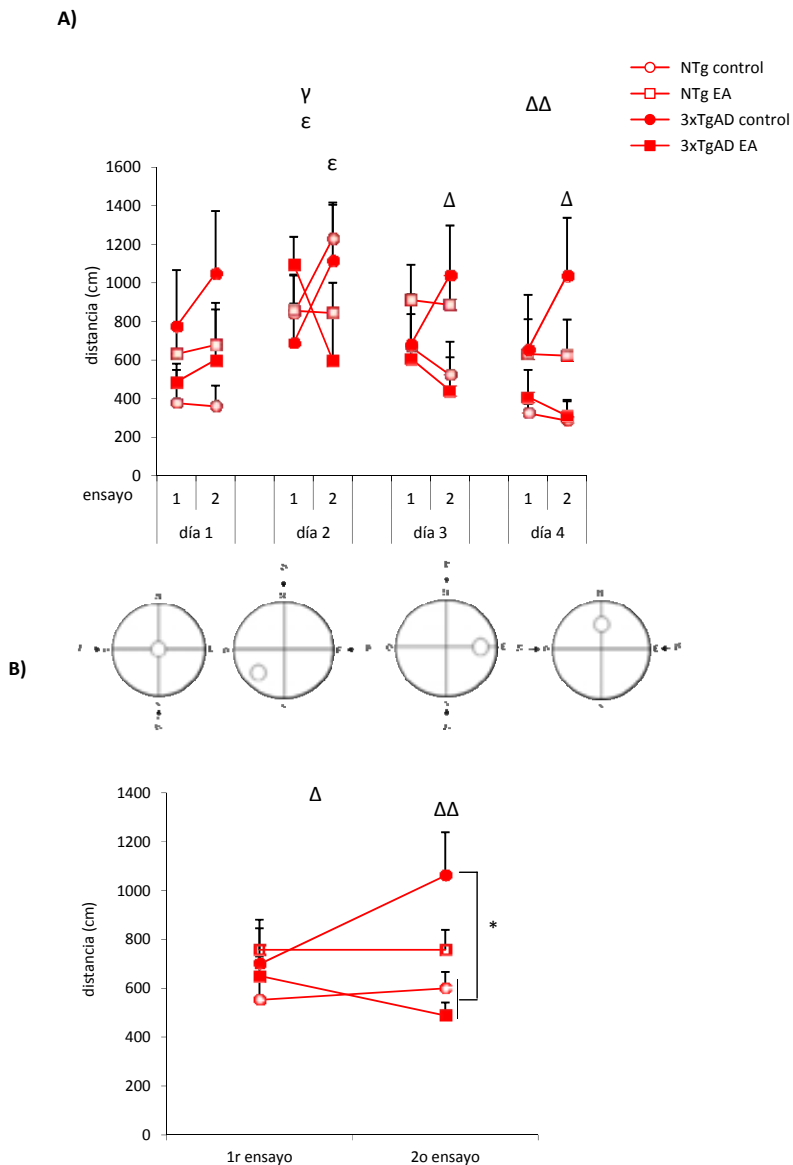


Figura 5.30.- Distancias medias recorridas ensayo por ensayo a lo largo de los 4 días de entrenamiento (A) y distancias medias recorridas en el primer y segundo ensayo (medias obtenidas a partir de los 4 días de entrenamiento) (B) en la tarea de 15s de “Delayed matching-to-place” por las hembras de 12 meses de edad (n=7-12 por grupo). Los resultados se representan como media \pm error estándar. Δ $P < 0.05$, $\Delta\Delta$ $P < 0.001$ efecto “genotipo x tratamiento”, γ $P < 0.05$ efecto “ensayo x tratamiento”, ϵ $P \leq 0.05$ efecto “tratamiento”, * $P < 0.05$ entre los grupos señalados, prueba post-hoc de Duncan.

Prueba de “emparejamiento retardado -20min- a una posición” (“20 min-Delayed matching-to-place”, DMP-20min)

Para el análisis de la tarea de DMP-20min, nos hemos limitado a representar las variables mostradas en las Figuras 5.31.A-B y 5.32., debido a que son los únicos parámetros que ofrecen resultados estadísticamente significativos. De este modo, tal y como muestra la Figura 5.31.A-B, los resultados del MANOVA “2 “sexo” x 2 “genotipo” x 2 “tratamiento”” indican que existe un efecto “ensayo” ($F_{1,66}=17.03$, $P<0.001$), más visible en hembras que en machos (MANOVA efecto “ensayo x sexo”: $F_{1,66}=4.90$, $P<0.05$; Fig. 5.31.B), ya que como se observa en la Figura 5.31.A, los machos 3xTgAD enriquecidos son el grupo que peor memoria a corto plazo muestran respecto al resto (MANOVA efecto “ensayo x genotipo x tratamiento”: $F_{1,66}=6.15$, $P<0.05$). Se observa además, que globalmente los animales 3xTgAD realizan peor la tarea de memoria a corto plazo que el grupo de NTg (MANOVA efecto “genotipo”: $F_{1,66}=6.52$, $P<0.05$).

Cuando analizamos los resultados de machos (Fig. 5.31.A) y hembras (Fig. 5.31.B) de manera independiente, observamos que en el caso de los machos (Fig. 5.31.A) el MANOVA “2 x “genotipo” x 2 “tratamiento”” muestra el efecto “ensayo x genotipo x tratamiento” comentado en el párrafo anterior. Así, volvemos a ver este aumento en las distancias recorridas, en el segundo ensayo de la tarea DMP-20min, por parte de los animales 3xTgAD enriquecidos ($F_{1,31}=8.87$, $P<0.05$). Si analizamos los datos del segundo ensayo independientemente, el ANOVA indica un efecto “genotipo x tratamiento” ($F_{1,31}=8.28$, $P<0.05$), donde el grupo 3xTgAD con EA difiere de su homólogo sin tratamiento (prueba *post-hoc* de Duncan en Fig. 5.31.A).

Al analizar los datos de las hembras (Fig. 5.31.B) independientemente, los resultados del MANOVA muestran que además del efecto “ensayo” ($F_{1,35}=17.29$, $P\leq 0.001$), indicativo de que los 4 grupos de hembras muestran un efecto de la

memoria a corto plazo para la tarea DMP-20min, se observa también un efecto “genotipo” ($F_{1,35}=5.05, P<0.05$) señalando que el grupo de hembras 3xTgAD realiza peor la tarea cuando se compara con el grupo NTg. Asimismo, al analizar los datos obtenidos en el segundo ensayo, vemos que el ANOVA ““2 “genotipo” x 2 “tratamiento”” vuelve a mostrar como el grupo 3xTgAD recorre mayores distancias en busca de la plataforma sumergida que los ratones NTg (efecto “genotipo”: $F_{1,35}=4.34, P<0.05$; sin diferencias en la prueba *post-hoc* de Duncan; Fig. 5.31.B).

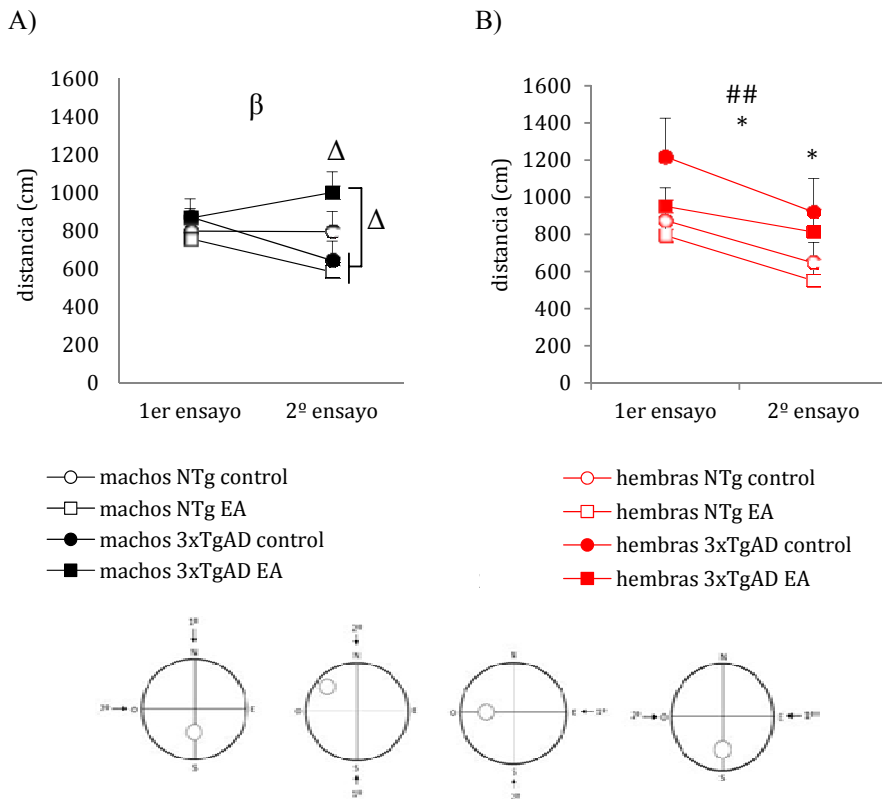


Figura 5.31.- Distancias medias recorridas en el primer y segundo ensayo (medias obtenidas a partir de los 4 días de entrenamiento) en la tarea de DMP-20min por los machos (A) y las hembras (B) de 12 meses de edad ($n=7-12$ por grupo). En la parte inferior se representan las localizaciones diarias de la plataforma y los puntos de entrada de los animales. Los resultados se representan como media \pm error estándar. $\beta P<0.05$ efecto “ensayo x genotipo x tratamiento”, $\Delta P<0.05$ efecto “genotipo x tratamiento” con prueba *pos-hoc* de Duncan, $## P\leq 0.001$ efecto “ensayo”, $* P<0.05$ efecto “genotipo”.

La Figura 5.32 muestra los resultados obtenidos al calcular la diferencia entre la distancia media recorrida en el primer ensayo de la tarea (durante los 4 días) de DMP-20min y la distancia media recorrida en el segundo ensayo. La Figura 5.32 representa los resultados de machos (izquierda de la gráfica) y hembras (derecha de la gráfica) para esta variable, entendida como un reflejo de la memoria a corto plazo, al haber transcurrido 20 minutos entre ensayos. Así, los resultados del análisis de ambos sexos conjuntamente indican que machos y hembras muestran diferencias para esta variable (ANOVA “2 “sexo” x 2 “genotipo” x 2 “tratamiento”, efecto “sexo”: $F_{1,66}=4.90$, $P<0.05$), presentando las hembras una mejor memoria a corto plazo que los machos en esta tarea, tal y como se observaba en la Figura 5.31 anterior. Asimismo, los resultados del ANOVA global muestran que el EA no produce el mismo efecto en animales 3xTgAD que NTg. Así, globalmente, el EA mejora la memoria a corto plazo en animales NTg, mientras que en el grupo 3xTgAD no se observa esta tendencia (ANOVA efecto “genotipo x tratamiento”: $F_{1,66}=6.15$, $P<0.05$).

Cuando analizamos los machos de manera individual, los resultados del ANOVA “2 “genotipo” x 2 “tratamiento”” muestran más claramente el efecto “genotipo x tratamiento” comentado anteriormente ($F_{1,31}=8.87$, $P<0.05$), indicando que el tratamiento de EA produce una mejora en la memoria a corto plazo en la DMP-20min en el caso de los machos NTg, mientras que se observa el efecto contrario en animales 3xTgAD. Sin embargo, en el caso de las hembras no se observa dicho efecto (ANOVA “2 “genotipo” x 2 “tratamiento”, efecto “genotipo x tratamiento”: $F_{1,35}=0.63$, *n.s.*).

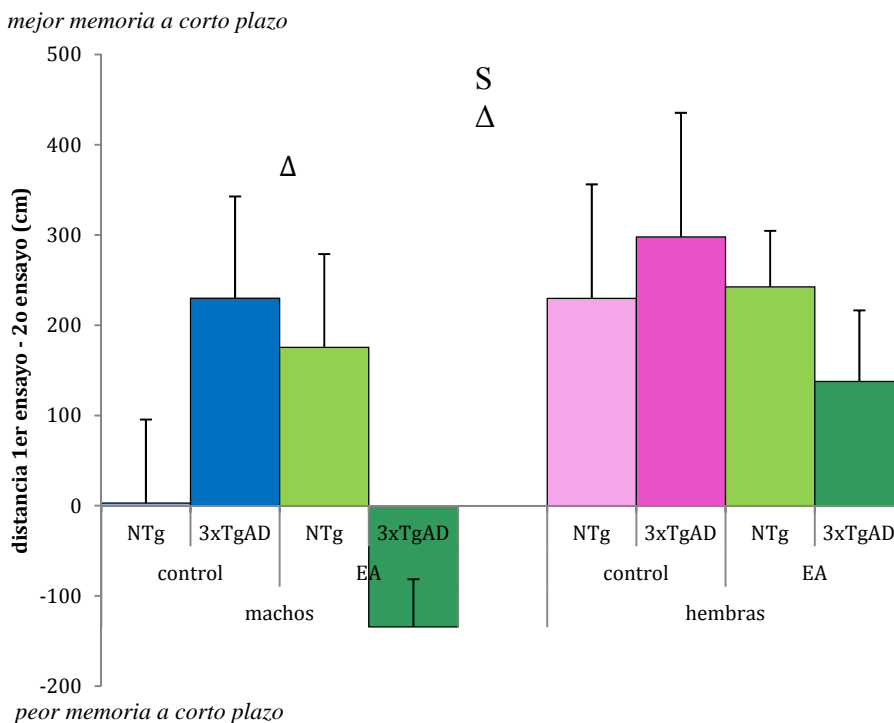


Figura 5.32.- Diferencia en machos (izquierda) y hembras (derecha) entre la distancia media (obtenida a partir de los 4 días) recorrida en el primer ensayo de la tarea de 20min de “Delayed matching-to-place” y la distancia media recorrida en el segundo ensayo, 20min después (n=7-12 por grupo). Los resultados se expresan como media \pm error estándar. Δ $P < 0.05$, efecto “genotipo x tratamiento” en machos y global; S $P < 0.05$, efecto “sexo”; ANOVA n.s. en hembras.

Aprendizaje guiado por señales locales

Para comprobar las capacidades motoras, visuales y posibles influencias motivacionales de los animales en la piscina de Morris (MWM), se testaron los ratones en la Prueba de aprendizaje guiado por señales (“Cue task”). Los resultados del MANOVA “2 “genotipo” x 2 “tratamiento”” sugieren que los 4 grupos de ambos sexos presentan unas capacidades motoras, visuales y motivacionales correctas a la hora de buscar la plataforma señalada con la bandera, sin mostrar diferencias en cuanto al genotipo y tratamiento (efecto

“genotipo”: $F_{1,30} \leq 2.62$, *n.s.*; efecto “tratamiento”: $F_{1,30} \leq 1.80$, *n.s.* para ambos sexos). Además, en ambos grupos se observa una mejora de la ejecución de la tarea a medida que avanzan los ensayos (MANOVA efecto “ensayo”: $F_{3,90} \geq 5.45$, $P < 0.005$ para ambos sexos).

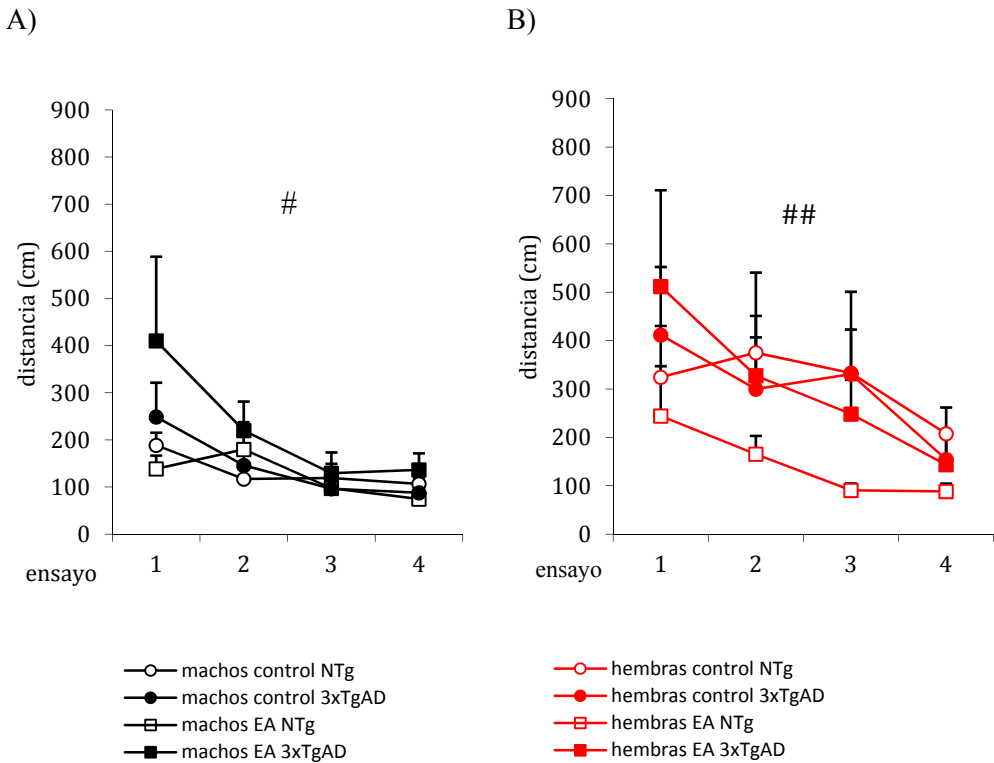


Figura 5.33.- Aprendizaje guiado por señales locales en machos **(A)** y hembras **(B)** de 12 meses de edad en la piscina de Morris con plataforma señalada por una bandera (CUE, $n=7-12$ por grupo). Los resultados se representan como media \pm error estándar. # $P < 0.05$ efecto “ensayo”, ## $P < 0.001$ efecto “ensayo”.

5.2.2. 15 meses de edad

Debido a la creciente mortalidad de los animales 3xTgAD como consecuencia de la edad, la batería conductual utilizada para testar los animales a los 15 meses de edad tuvo que ser reducida la Prueba de evaluación de las capacidades sensorio-motoras, un único test de evaluación de la conducta exploratoria y ansiedad/temerosidad (en este caso, el Campo abierto) y, en última instancia, el test de evaluación del nivel de aprendizaje/memoria espacial de los animales (diversos paradigmas en el MWM).

5.2.2.1. Pruebas de resistencia física, Test del reflejo visual y Test de las esquinas

Con el objetivo de comprobar cuáles eran las características físicas de los ratones de 15 meses de edad, tal y como se llevó a cabo con los animales a los 12 meses, los ocho grupos de ratones (NTg y 3xTgAD, controles y EA, para ambos sexos) fueron testados en diversas pruebas sensorio-motoras (ver Tabla 5.6.). Las capacidades visuales de los animales también fueron evaluadas, mostrando que los ratones 3xTgAD de ambos sexos no muestran ningún tipo de disfunción visual aparente o gruesa (datos no incluidos).

Tal y como viene indicado en la Tabla 5.6, los animales 3xTgAD no muestran déficits motores a los 15 meses de edad respecto a los animales NTg, mostrando incluso, de igual modo que sucedía a los 12 meses de edad, capacidades motoras superiores a las del grupo NTg en algunas pruebas (ver “latencias de caída” de las barras de hierro y madera, así como en la prueba de la percha de 5s y 60s).

Por otro lado, el tratamiento de enriquecimiento ambiental muestra algunos efectos, principalmente en machos (igual que sucedía en los ratones a los 12 meses de edad), mostrando el efecto contrario de lo que sucedía a los 12 meses. Es decir, los animales enriquecidos muestran menor “latencia de caída” en la barra de hierro y en la prueba de la percha de 5s, y menor “número de extremidades con las que se sujetan” en la prueba de la percha-5s (ver significaciones estadísticas en la siguiente Tabla 5.6).

En cuanto al Test de las esquinas, el ANOVA “2 “sexo” x 2 “genotipo” x 2 “tratamiento”” muestra que, globalmente, los animales 3xTgAD realizan menos levantamientos que los NTg (ANOVA efecto “genotipo”: $F_{1,59}=12.77$, $P\leq 0.001$) y, mientras que el EA en machos disminuye el “número de levantamientos” y “esquinas exploradas”, en hembras lo incrementa (ANOVA efecto “sexo x tratamiento”: $F_{1,59}\geq 4.38$, $P<0.05$ para ambos). Asimismo, observamos que el grupo de machos 3xTgAD explora menos esquinas que los NTg, mientras que las hembras 3xTgAD exploran más esquinas (ANOVA efecto “sexo x genotipo”: $F_{1,59}=4.94$, $P<0.05$) que las NTg.

Tabla 5.6. (1a parte)

	Machos de 15 meses				Valor F g.l. (1,27)	P ≤
	NTg		3xTgAD			
	control n=9	EA n=8	control n=7	EA n=7		
Peso (g)	31.78 ± 0.89	34.24 ± 1.64	29.55 ± 2.00	40.17 ± 2.63	G 1.07 T 13.30 GxT 5.18	n.s. 0.001 0.05
<u>Test de las esquinas</u>						
Nº corners	9.44 ± 1.16	6.50 ± 0.94	5.86 ± 1.68	4.28 ± 0.97	G 5.72	0.05
Nº rearings	3.78 ± 0.49	2.12 ± 0.87	1.57 ± 0.81	0.14 ± 0.14	G 10.20 T 5.52	0.005 0.05
Nº defecaciones	0.11 ± 0.11	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.28 ± 0.28	G 0.36	n.s.
<u>Barra de madera</u>						
Lat. caída (s)	20.00 ± 0.00	18.24 ± 6.44	20.00 ± 0.00	20.00 ± 0.00	G 2.08	n.s.
Nº segmentos	0.22 ± 0.08	1.19 ± 0.42	0.26 ± 0.10	2.08 ± 0.79	G 0.04	n.s.
<u>Barra de hierro</u>						
Lat. caída (s)	4.37 ± 1.20	2.53 ± 0.71	15.98 ± 1.16	7.10 ± 2.80	G 26.16 T 11.49 GxT 4.94	0.001 0.005 0.05
Nº segmentos	0.00 ± 0.00	0.44 ± 0.37	0.21 ± 0.10	0.14 ± 0.14	G 0.37	n.s.
<u>Percha-5s</u>						
Lat. caída (s)	4.08 ± 0.42	1.74 ± 0.51	4.55 ± 0.31	3.38 ± 0.62	G 4.83 T 13.32	0.05 0.001
Nº segmentos	0.39 ± 0.23	0.06 ± 0.06	0.14 ± 0.14	0.36 ± 0.14	G 0.02	n.s.
Nº extremidades	3.50 ± 0.53	2.00 ± 0.09	3.14 ± 0.46	2.36 ± 0.24	G 0.000 T 8.39	n.s. 0.05
<u>Percha-60s</u>						
Lat. caída (s)	24.00 ± 8.00	1.57 ± 0.55	23.29 ± 8.82	20.10 ± 7.61	G 3.18	n.s.
Nº segmentos	2.33 ± 0.86	0.00 ± 0.00	1.86 ± 0.67	2.00 ± 0.58	G 1.38	n.s.
Nº extremidades	3.89 ± 0.56	1.87 ± 0.23	3.43 ± 0.57	2.86 ± 0.46	G 7.15	0.05

Tabla 5.6. (2a parte)

	Hembras de 15 meses				Valor F g.l. (1,35)	P ≤
	NTg		3xTgAD			
	control n=10	EA n=12	control n=10	EA n=7		
Peso (g)	35.44 ± 0.97	36.85 ± 1.97	34.86 ± 2.55	34.94 ± 4.06	G 0.27	<i>n.s.</i>
<u>Test de las esquinas</u>						
Nº corners	5.90 ± 0.57	6.75 ± 0.87	6.60 ± 0.72	7.71 ± 0.94	G 1.07	<i>n.s.</i>
Nº rearings	2.50 ± 0.43	3.33 ± 0.61	1.70 ± 0.54	2.00 ± 0.72	G 3.30	<i>n.s.</i>
Nº defecaciones	0.70 ± 0.26	0.75 ± 0.22	0.30 ± 0.15	0.14 ± 0.14	G 5.44	0.05
<u>Barra de madera</u>						
Lat. caída (s)	18.76 ± 0.64	18.98 ± 0.65	18.74 ± 1.26	20.00 ± 0.00	G 0.35	<i>n.s.</i>
Nº segmentos	0.20 ± 0.15	0.21 ± 0.13	1.80 ± 1.01	1.50 ± 0.87	G 5.37	0.05
<u>Barra de hierro</u>						
Lat. caída (s)	2.97 ± 1.34	3.83 ± 0.94	14.15 ± 1.90	11.37 ± 2.91	G 29.42	0.001
Nº segmentos	0.00 ± 0.00	0.04 ± 0.04	0.35 ± 0.24	0.00 ± 0.00	G 1.49	<i>n.s.</i>
<u>Percha-5s</u>						
Lat. caída (s)	2.41 ± 0.46	2.05 ± 0.50	4.36 ± 0.27	3.39 ± 0.37	G 13.60	0.001
Nº segmentos	0.05 ± 0.01	0.04 ± 0.04	0.10 ± 0.07	0.57 ± 0.41	G 3.42	<i>n.s.</i>
Nº extremidades	1.90 ± 0.21	2.12 ± 0.36	2.50 ± 0.23	2.57 ± 0.23	G 2.57	<i>n.s.</i>
<u>Percha-60s</u>						
Lat. caída (s)	7.23 ± 5.87	10.97 ± 6.62	36.06 ± 8.51	45.31 ± 9.59	G 17.04	0.001
Nº segmentos	0.50 ± 0.40	0.92 ± 0.69	2.50 ± 0.86	4.00 ± 1.25	G 10.11	0.005
Nº extremidades	1.80 ± 0.39	2.00 ± 0.43	3.50 ± 0.50	4.14 ± 0.55	G 16.23	0.001

Tabla 5.6.- Pruebas sensorio-motoras de machos y hembras NTg y 3xTgAD, controles y enriquecidos (EA) de 15 meses de edad (n=7-12 por grupo). "Lat. caída": latencia media (obtenida a partir de 2 ensayos) de caída en el test; "Nº segmentos": Número medio (obtenido a partir de 2 ensayos) de segmentos de 5cm recorridos en el test; "Nº extremidades": Número medio (obtenido a partir de 2 ensayos) de extremidades con las que el animal se sujeta al test. La duración del test de la "Barra de madera", la "Barra de hierro" y la Percha-60s fue de 60 segundos por ensayo (2 ensayos cada test), mientras que la duración del test "Percha-5s" fue de 5 segundos por ensayo (test de 2 ensayos). Los resultados se expresan como media ± error estándar. **G** efecto "genotipo", **T** efecto "tratamiento", **GxT** efecto "genotipo x tratamiento".

5.2.2.2. Conducta en el test del Campo abierto

Para comprobar si existen diferencias en el patrón de actividad exploratoria y locomotora de los ratones transgénicos respecto a los NTg, así como los efectos del tratamiento de EA, tal y como se llevó a cabo a los 12 meses de edad los animales fueron testados en la prueba del Campo abierto. Los resultados obtenidos a los 12 meses de edad de los ratones, ya mostraban la presencia de diferencias sexuales en diversas variables analizadas mediante el ANOVA “2 “sexo” x 2 “genotipo” x 2 “tratamiento””, y es por eso que los datos fueron analizados posteriormente de manera independiente para la variable “sexo”. Siguiendo la misma lógica los resultados de ambos sexos obtenidos a los 15 meses fueron analizados de manera independiente.

La Figura 5.34.A-F muestra la “latencia de movimiento” (A-B), “latencia de entrada a la periferia” (C-D) y “número de defecaciones” (E-F) en el test, para los 8 grupos de ratones a los 15 meses de edad.

En cuanto a la “latencia de movimiento”, los resultados del ANOVA “2 “genotipo” x 2 “tratamiento””, tanto de machos (Fig. 5.34.A) como de hembras (Fig. 5.34.B), indican que los ratones 3xTgAD muestran más conducta de petrificación inicial (“freezing”; indicando mayores niveles de ansiedad/temerosidad) que los animales NTg (ANOVA efecto “genotipo”: $F_{1,27}=9.96$, $P<0.005$, y $F_{1,35}=9.28$, $P<0.005$, para machos y hembras respectivamente). Cuando analizamos la evolución de dicha variable de los 12 a los 15 meses de edad, el MANOVA “2 “edad” x 2 “genotipo” x 2 “tratamiento”” señala que, tanto en machos como en hembras, se mantiene el efecto “genotipo” comentado arriba (MANOVA efecto “genotipo”: $F_{1,27}=13.88$, $P\leq 0.001$; $F_{1,35}=8.84$, $P\leq 0.005$, para machos y hembras respectivamente). En hembras, además, observamos que en edades más avanzadas (a los 15 meses) la conducta de petrificación inicial en el test del Campo abierto se acentúa, como reflejo del posible incremento de la ansiedad/temerosidad en los

animales (MANOVA efecto “genotipo x edad”: $F_{1,35}=7.07$, $P<0.05$; compárese la Fig. 5.16.B con la Fig. 5.34.B).

Cuando observamos la “latencia de entrada en la periferia”, como variable complementaria al estudio de la petrificación inicial de los ratones en el Campo abierto, los resultados del ANOVA “2 “genotipo” x 2 “tratamiento”” muestran que, en concordancia con el incremento de la conducta de petrificación inicial de los ratones 3xTgAD en relación a los NTg, los animales transgénicos también muestran mayores “latencias de entrada a la periferia” que los animales NTg (ANOVA efecto “genotipo”: $F_{1,27}=13.16$, $P\leq 0.001$ para machos, $F_{1,35}=6.15$, $P<0.05$ para hembras). Al comparar la conducta de los ratones de los 12 a los 15 meses de edad, el MANOVA “2 “edad” x 2 “genotipo” x 2 “tratamiento”” indica que esta conducta de petrificación de los ratones 3xTgAD al inicio del test se mantiene, aún a pesar de que los animales hayan pasado previamente por el mismo test conductual a los 12 meses (MANOVA efecto “genotipo”: $F_{1,27}=24.32$, $P<0.001$ para machos; $F_{1,35}=11.90$, $P\leq 0.001$ para hembras).

Por otro lado, como se indica en la Figura 5.34., el “número de defecaciones” no muestra diferencias entre genotipos (ANOVA efecto “genotipo”: $F_{1,27}=0.30$ para machos y $F_{1,27}=2.35$ para hembras; ambos *n.s.*). Mientras que al observar la evolución de esta variable de los 12 a los 15 meses de edad, en el caso de las hembras el MANOVA “2 “edad” x 2 “genotipo” x 2 “tratamiento”” señala que el grupo 3xTgAD defeca más que el NTg (MANOVA efecto “genotipo”: $F_{1,35}=14.47$, $P\leq 0.001$). Si bien, en machos, el MANOVA indica que, así como a los 12 meses los 3xTgAD defecaban más que los NTg, a los 15 meses ya no encontramos esa diferencia entre genotipos (MANOVA efecto “edad”: $F_{1,27}=4.24$, $P<0.05$).

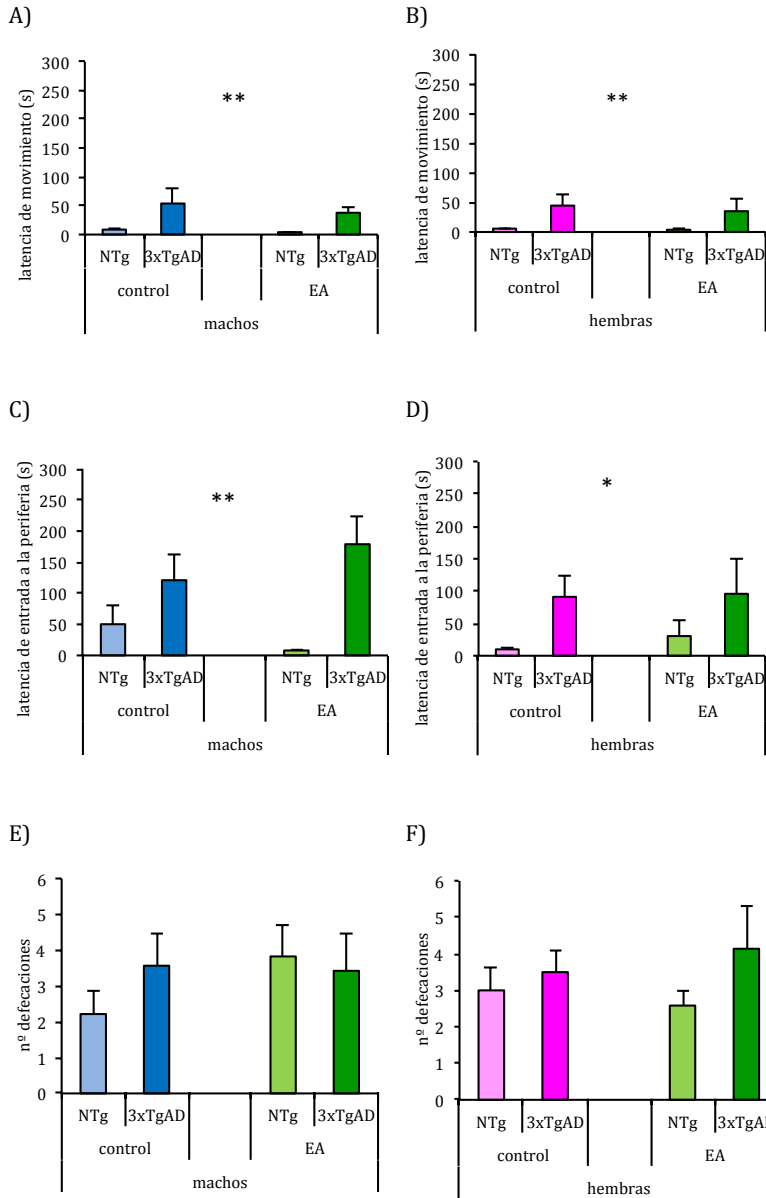


Figura 5.34.- Latencia de movimiento (A-B), latencia de entrada a la periferia (C-D) y número de defecaciones (E-F) de machos y hembras NTg y 3xTgAD, no tratados y tratados con EA, de 15 meses de edad, en el test de Campo abierto (n=7-12 por grupo). Los resultados se representan como media \pm error estándar. * $P < 0.05$ y ** $P < 0.005$ efecto "genotipo".

La Figura 5.35.A-D representa la conducta exploratoria y locomotora de los animales de los 8 grupos, de 15 meses de edad, en el test del Campo abierto.

Cuando observamos el “número de cruces total” (Fig. 5.35.A-B), no encontramos diferencias entre “genotipos” (ANOVA “2 “genotipo” x 2 “tratamiento” en machos: $F_{1,27}=0.02$, *n.s.*; en hembras: $F_{1,35}=1.15$, *n.s.*). Mientras que, cuando analizamos el “número de levantamientos” (*rearings*) total de machos y hembras conjuntamente (Fig. 5.35.C-D), observamos que los ratones 3xTgAD realizan un menor número de exploraciones verticales que los NTg (ANOVA “2 “sexo” x 2 “genotipo” x 2 “tratamiento””, efecto “genotipo”: $F_{1,59}=4.69$, $P<0.05$). Sin embargo, ambos sexos analizados de manera individual no muestran diferencias significativas entre genotipos.

Al comparar la conducta exploratoria, horizontal y vertical, de los 12 a los 15 meses (compárense las Fig. 5.17 y 5.35), el MANOVA “2 “edad” x 2 “genotipo” x 2 “tratamiento”” para las variables “número de cruces totales” y “numero de levantamientos totales” indica que, tanto machos como hembras muestran un “recuerdo” de haber pasado por la misma tarea a los 12 meses, a lo que nos referiremos como un efecto de “habitución” o de “transferencia”. Así, los resultados muestran una disminución de la actividad exploratoria tanto en machos (para el “número de levantamientos total”, MANOVA efecto “edad”: $F_{1,27} =9.47$, $P\leq 0.05$) como en hembras (para el “número de cruces total”, MANOVA efecto “edad”: $F_{1,35}=26.45$, $P\leq 0.001$; para el “número de levantamientos total”, MANOVA efecto “edad”: $F_{1,35} =53.17$, $P<0.001$), señalando que, globalmente, los animales de 15 meses “recuerdan” haber pasado por el Campo abierto previamente.

A diferencia de la clara tendencia que muestran las hembras en cuanto al efecto de reducción de la actividad exploratoria horizontal y vertical entre los 15 y los 12 meses, en machos, la “habitución” de la actividad exploratoria horizontal la observamos en el grupo NTg (MANOVA efecto “genotipo x edad”:

$F_{1,27} = 9.47, P \leq 0.05$), debido a que a los 12 meses era el genotipo con mayor actividad exploratoria (MANOVA efecto "genotipo": $F_{1,27} = 29.09, P < 0.001$) (ver Figura 5.17.). En los machos 3xTgAD no observamos este efecto de "habitación". De hecho, los machos 3xTgAD no enriquecidos de 15 meses incrementan la conducta exploratoria horizontal respecto a los 12 meses (MANOVA efecto "genotipo x edad": $F_{1,27} = 15.09, P \leq 0.001$; compárense la Fig. 5.17.A con la Fig. 5.35.A).

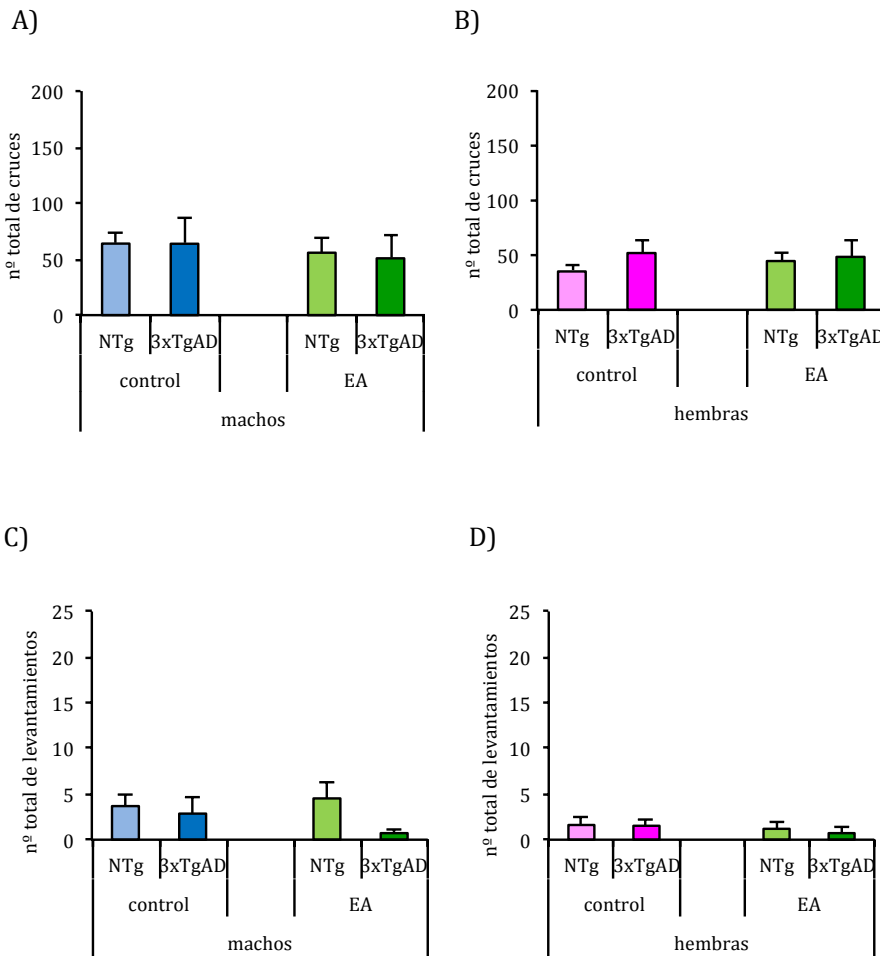


Figura 5.35.- Número de “cruces totales” (A-B) y “levantamientos totales” (C-D) de machos y hembras, NTg y 3xTgAD, no tratados (controles) y con enriquecimiento ambiental (EA), de 15 meses de edad, en el OF (n=7-12 por grupo). Los resultados se expresan como medias \pm error estándar.

Para evaluar mejor la memoria (“habitación” o “transferencia”) a largo plazo de los animales en el test del Campo abierto, observamos cómo era el recuerdo que los ratones tenían de su paso por el test a los 12 meses de edad. Para ello, analizamos la diferencia entre el “número de cruces total realizado a los 12 meses de edad” y el “número de cruces realizado 3 meses después”, al volver a pasar los animales por el test a los 15 meses de edad. En la Figura 5.36.A-B se muestra dicha diferencia (para observar mejor las diferencias entre grupos en la Figura, al resultado de esta diferencia se le han sumado 40 unidades, eliminando así los valores negativos) en los 4 grupos de machos y hembras, controles y enriquecidos. El ANOVA “2 “sexo” x 2 “genotipo” x 2 “tratamiento”” indica que los animales 3xTgAD muestran peor “habitación/transferencia”, o memoria a largo plazo, que los NTg (ANOVA efecto “genotipo”: $F_{1,62}=16.62$, $P<0.001$). Esta diferencia entre grupos es especialmente evidente en machos (ANOVA efecto “genotipo x sexo”: $F_{1,62}=5.85$, $P<0.05$). De este modo, si analizamos ambos sexos de manera individual, los resultados del ANOVA “2 “genotipo” x 2 “tratamiento””, en machos, muestran mejor memoria a largo plazo del grupo NTg vs. el 3xTgAD (ANOVA efecto “genotipo”: $F_{1,27}=15.09$, $P\leq 0.001$), mientras que en hembras no encontramos diferencias estadísticamente significativas (ANOVA efecto “genotipo”: $F_{1,35}=1.93$, *n.s.*).

En cuanto a los efectos del tratamiento de EA, los resultados del ANOVA “2 “sexo” x 2 “genotipo” x 2 “tratamiento”” en ambos sexos indican que existe una tendencia del enriquecimiento a incrementar la memoria a largo plazo en los ratones 3xTgAD (ANOVA efecto “genotipo x tratamiento”: $F_{1,62}=3.69$, $P=0.059$).

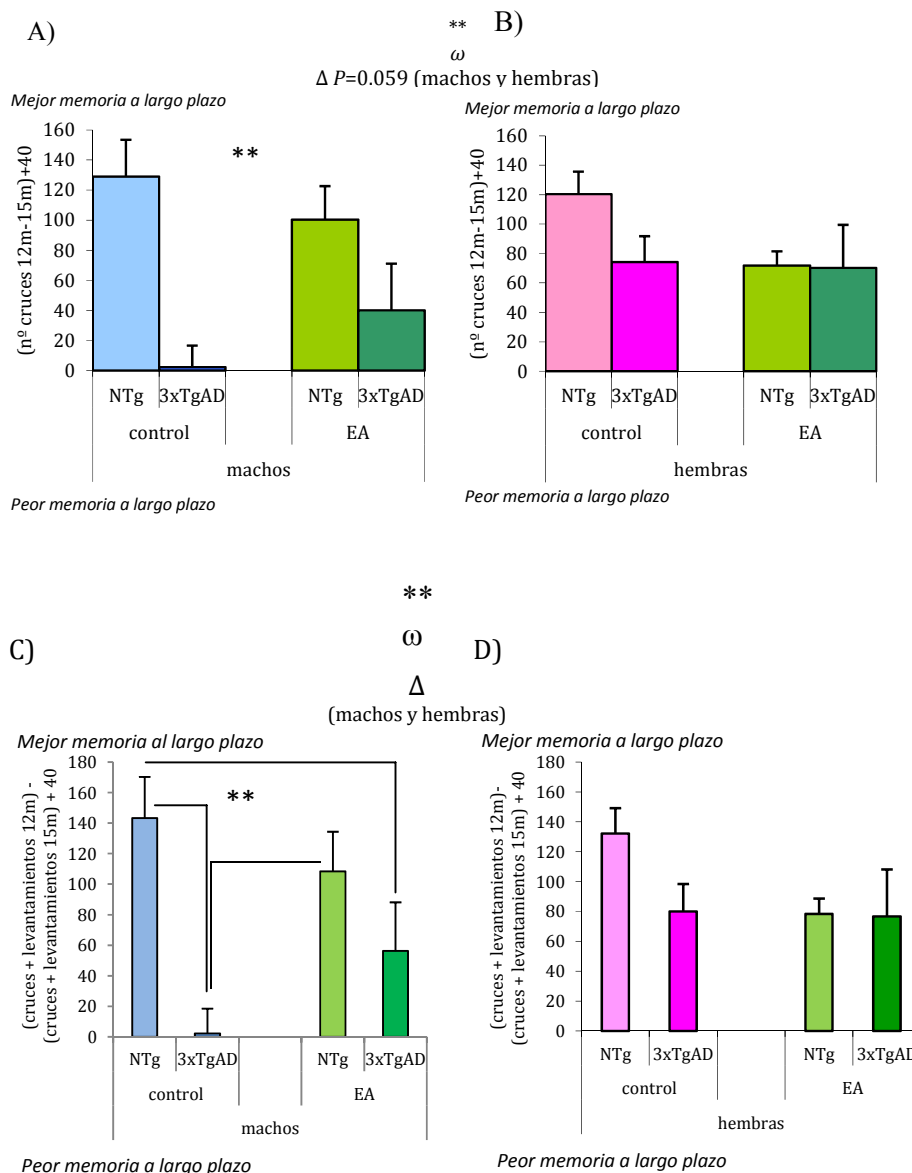


Figura 5.36.- Valoración de la memoria a largo plazo de los 8 grupos de ratones (NTg y 3xTgAD, controles y EA, de ambos sexos) entendida como **A-B)** la diferencia entre el número de cruces total realizado en el OF a los 12 meses y el número de cruces realizado a los 15 meses de edad; **C-D)** la diferencia entre el número de “cruces + levantamientos” totales realizado en el OF a los 12 meses y los 15 meses de edad (n=7-12 por grupo). Los resultados se expresan como media \pm error estándar. $**P \leq 0.001$ efecto “genotipo”; $\Delta P=0.059$, efecto “genotipo x tratamiento” en **A-B)** (machos y hembras conjuntamente). En **C-D)** Las barras señalan las diferencias entre grupos en la prueba post-hoc de Duncan. $\Delta P < 0.05$ efecto “genotipo x tratamiento” (machos y hembras conjuntamente).

En la Figura 5.36. C-D, se analizó la variable de “actividad exploratoria global” compuesta por la diferencia entre el “sumatorio del número de cruces y levantamientos totales a los 12 meses de edad” y el “sumatorio del número de cruces y levantamientos totales a los 15 meses de edad” (resultado al que se le añadieron 40 unidades con tal de que la Figura se observase más claramente). De este modo, los resultados del ANOVA “2 “sexo” x 2 “genotipo” x 2 “tratamiento”” indican que, globalmente, los ratones 3xTgAD muestran peor recuerdo de su experiencia previa en el Campo abierto que el grupo NTg (ANOVA efecto “genotipo”: $F_{1,61}=15.61$, $P<0.001$), efecto que es más evidente en machos que en hembras (ANOVA efecto “genotipo x sexo”: $F_{1,62}=4.98$, $P<0.05$). Además, el ANOVA muestra como los ratones 3xTgAD tratados con EA muestran mayores niveles de “habituaación/transferencia” al Campo abierto a los 15 meses, que el grupo 3xTgAD sin enriquecimiento (ANOVA “genotipo x tratamiento”: $F_{1,61}=4.97$, $P<0.05$; ver pruebas Duncan en Fig. 5.36.C).

Al analizar ambos sexos de manera independiente, los resultados del ANOVA “2 x “genotipo” x 2 “tratamiento”” muestran que en el caso de los machos, el grupo 3xTgAD presenta una peor memoria a largo plazo que el grupo NTg (ANOVA efecto “genotipo”: $F_{1,26}=13.43$, $P\leq 0.001$; test *post-hoc* de Duncan, Fig. 5.36.C), tendencia que no llega a la significación estadística en hembras (ANOVA efecto “genotipo”: $F_{1,35}=2.10$, *n.s.*).

5.2.2.3. Laberinto acuático de Morris:

Tarea de aprendizaje/memoria espacial de referencia (“Place task”)

En la Figura 5.37. se muestran los resultados de la velocidad media de natación de machos y hembras de 15 meses de edad, de los grupos NTg y 3xTgAD. Los datos muestran que, igual que ocurría a los 2.5, 6 y 12 meses de edad, el grupo

3xTgAD presenta una mayor velocidad de natación que el NTg tanto en machos ($t_{1,14}=11.73$, $P\leq 0.001$) como en hembras ($t_{1,18}=-3.89$, $P\leq 0.001$). Teniendo en cuenta esta diferencia en la velocidad de natación en función del genotipo, decidimos escoger la “distancia recorrida” (en lugar de la “latencia de llegada a la plataforma”) como variable dependiente de ejecución del aprendizaje.

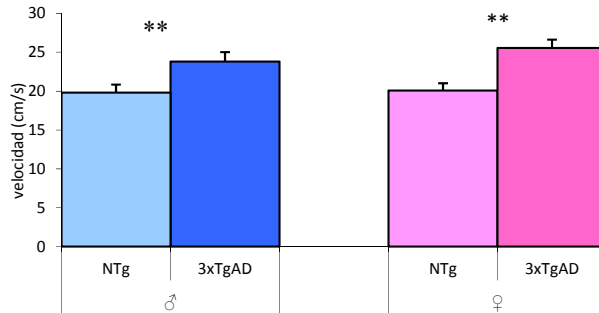


Figura 5.37.- Diferencia en la velocidad media de natación entre genotipos a los 15 meses de edad en el Laberinto acuático de Morris ($n=7-10$ por grupo). La velocidad se calculó a partir de los ensayos de la primera tarea, o tarea de aprendizaje espacial de referencia (PT). Se representan medias \pm error estándar. ****** $P\leq 0.001$ entre ambos grupos (*t* de Student).

En la Figura 5.38. se ilustran los resultados de la tarea de aprendizaje espacial de referencia de los 8 grupos experimentales a los 15 meses de edad. Podemos observar que existe una mejora del aprendizaje por parte de los 8 grupos a medida que avanzan los días, hasta llegar todos al mismo nivel de adquisición de la tarea de aprendizaje/memoria espacial el día 5 (MANOVA “2 “genotipo” x 2 “sexo” x 2 “tratamiento” x 5 “día””, efecto “día”: $F_{4,244}=19.40$, $P<0.001$). Además, observamos un efecto “genotipo x sexo x día” (MANOVA, $F_{4,244}=2.61$, $P<0.05$), es decir, los machos 3xTgAD muestran menores distancias recorridas que las hembras 3xTgAD en la búsqueda de la plataforma sumergida, mientras que los animales NTg de ambos sexos, muestran distancias recorridas similares.

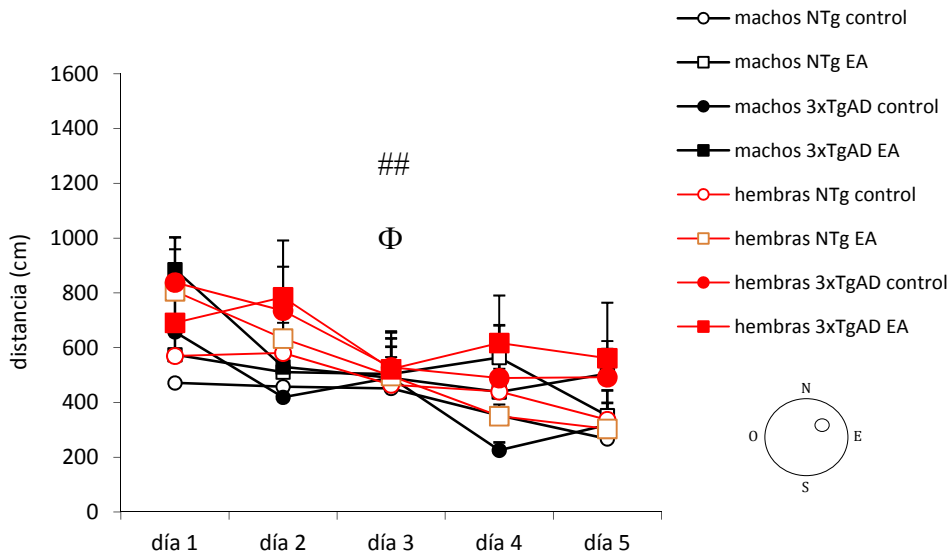


Figura 5.38.- Tarea de aprendizaje/memoria espacial de referencia: Curva de distancias recorridas en el Laberinto acuático de Morris por los 8 grupos experimentales, los cuales incluyen los genotipos NTg y 3xTgAD, ambos sexos, controles (no tratados) y tratados con enriquecimiento ambiental, a los 15 meses de edad ($n=7-12$ por grupo). A la derecha se representa la localización de la plataforma. ## $P<0.001$ efecto "día", Φ $P<0.05$ efecto "genotipo x sexo x día".

Los resultados del MANOVA "2 "día" x 2 "sexo" x 2 "genotipo" x 2 "tratamiento" (de los 2 primeros días de adquisición) indican que además de haber una mejora de la ejecución de la tarea el 2º día de entrenamiento respecto al 1º (MANOVA efecto "día": $F_{1,62}=9.05$, $P<0.005$), también se observa una interacción "día x sexo x genotipo" ($F_{1,62}=5.71$, $P<0.05$). Siguiendo la lógica llevada a cabo en el análisis a los 12 meses de edad, para ilustrar con mayor claridad los efectos de interacción con el "genotipo" y el "sexo" mencionados, presentamos los mismos en la Figura 5.39. De este modo, cuando desglosamos dicho efecto y realizamos un ANOVA "2 "genotipo" x 2 "tratamiento" con la media obtenida de las distancias recorridas los 2 primeros días de "Place task", los resultados no indican diferencias entre genotipos (ANOVA efecto

“genotipo”: $F_{1,66}=2.59$, *n.s.*; ver Fig. 5.39.A), mientras que al realizar el análisis del efecto “2 “sexo” x 2 “tratamiento””, observamos que las hembras realizan peor que los machos la tarea de adquisición, durante los dos primeros días de PT (ANOVA efecto “sexo”: $F_{1,66}=4.07$, $P<0.05$; ver Fig. 5.39.B).

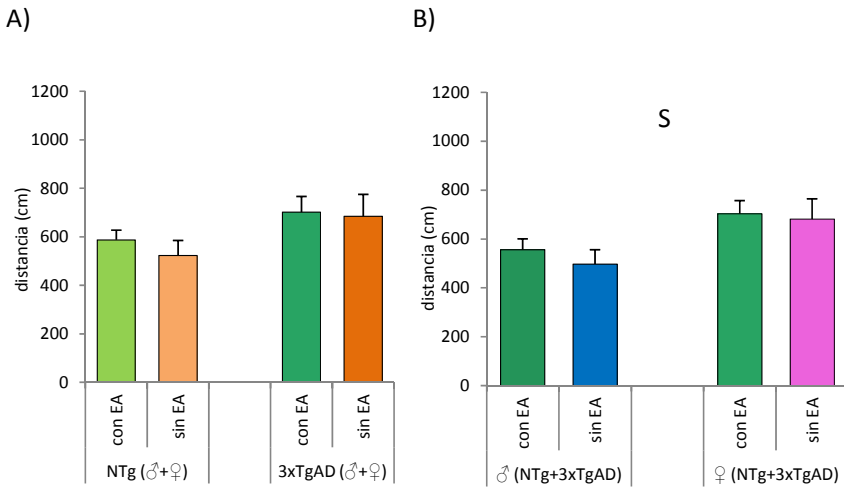


Figura 5.39.- Media de las distancias recorridas los días 1 y 2, en la tarea de aprendizaje espacial del MWM. **A)** se representan los 2 grupos de animales NTg y los 2 grupos de ratones 3xTgAD, con ambos tratamientos. Ambos genotipos incluyen los individuos de los dos sexos. **B)** se representan los 2 grupos de machos y los 2 grupos hembras, con ambos tratamientos. Ambos sexos incluyen los individuos de los dos genotipos (grupo con EA: $n=15-16$; sin EA: $n=16-20$). Los resultados se expresan como media \pm error estándar. S $P<0.05$ efecto “sexo”.

En la Figura 5.40. se muestra la diferencia entre las distancias medias recorridas el último día de “Place task” a los 12 meses de edad y el 1er día de “Place task” a los 15 meses de edad en los 8 grupos de animales (NTg y 3xTgAD, controles y con EA, de ambos sexos). El ANOVA “2 “sexo” x 2 “genotipo” x 2 “tratamiento”” indica que el EA tiende a mejorar la memoria (o “transferencia”) a largo plazo en machos 3xTgAD, es decir, parece mejorar el recuerdo del entrenamiento previo en la tarea de “Place task” a los 12 meses (ANOVA efecto “genotipo x tratamiento x sexo”: $F_{1,62}=3.84$, $P=0.054$; Fig. 5.40). Cuando analizamos ambos sexos por separado, encontramos que en machos se

observa un efecto del tratamiento de enriquecimiento ambiental de incremento de dicha *transferencia* a largo plazo (ANOVA “2 “genotipo” x 2 “tratamiento”, efecto “tratamiento”: $F_{1,27}=4.71$, $P<0.05$; Fig. 5.40 izquierda), que no observamos en hembras (ANOVA “2 “genotipo” x 2 “tratamiento”, efecto “tratamiento”: $F_{1,35}=0.11$, *n.s.*; Fig. 5.40 derecha).

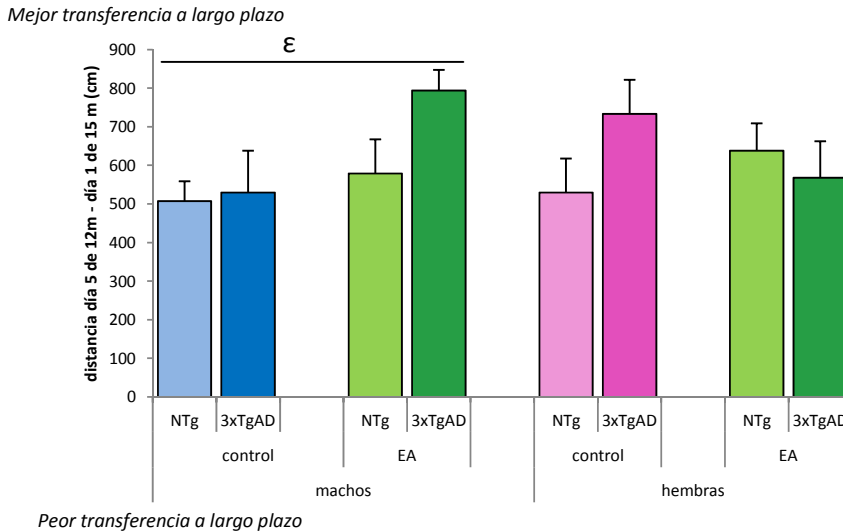


Figura 5.40.- *Diferencia entre las distancias medias recorridas el último día de la “PT” a los 12 meses de edad, y la distancia media recorrida el 1er día de “PT” realizada a los 15 meses de edad, en los 8 grupos de ratones NTg y 3xTgAD, controles y EA, de ambos sexos (n=7-12 por grupo). Los resultados se expresan como media ± error estándar. ε P<0,05 efecto “tratamiento”.*

Para observar con más claridad las diferencias entre ambos genotipos, así como los diversos efectos del tratamiento de enriquecimiento ambiental en machos y hembras, a continuación estudiaremos los dos sexos por separado, del mismo modo que hemos hecho con los resultados obtenidos a los 12 meses de edad de los animales.

Tarea de aprendizaje/memoria espacial en machos

La Figura 5.41. muestra la curva de aprendizaje de los 4 grupos de machos de 15 meses de edad, en la tarea de aprendizaje espacial de referencia en el MWM.

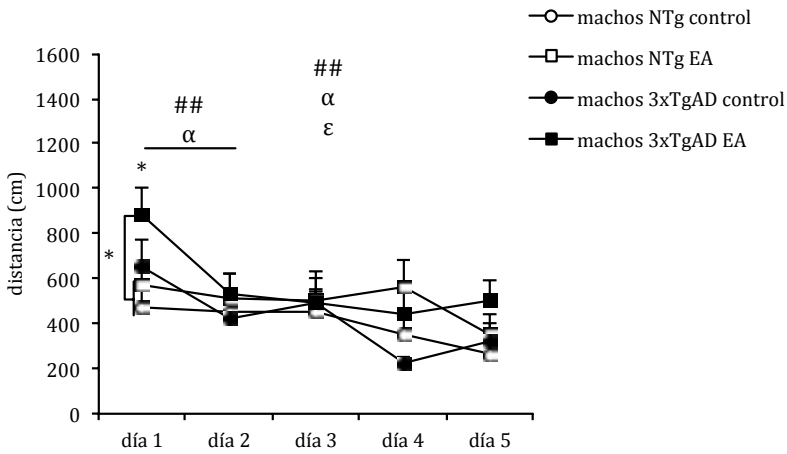
La Figura 5.41.A indica que los cuatro grupos de machos muestran una mejora de la ejecución de la tarea de aprendizaje espacial de referencia a medida que pasan los días (MANOVA “5 “día” x 2 “genotipo” x 2 “tratamiento””, efecto “día”: $F_{3,66,95,23}=7.56$, $P<0.001$). Esta mejora del aprendizaje se muestra más acentuada en animales 3xTgAD que en NTg, en parte debido a que el grupo 3xTgAD empieza con una peor ejecución de la tarea que los NTg (MANOVA efecto “genotipo x día”: $F_{3,66,95,23}=3.39$, $P<0.05$). El MANOVA de los resultados también indica que existe un efecto del tratamiento de EA, en el sentido que los animales enriquecidos recorren mayores distancias para encontrar la plataforma sumergida que los NTg (MANOVA efecto “tratamiento”: $F_{1,26}=5.15$, $P<0.05$).

Siguiendo la lógica descrita a los 12 meses de edad, cuando analizamos los dos primeros días de adquisición, el MANOVA de los resultados muestra la mejora de la ejecución de la tarea de adquisición el segundo día respecto al primero (MANOVA efecto “día”: $F_{1,27}=13.96$, $P\leq 0.001$). Además, también podemos observar una marcada mejoría de la adquisición de la tarea en el caso de los machos 3xTgAD, mientras que en los machos NTg dicha mejoría es más leve (MANOVA efecto “genotipo x día”: $F_{1,27}=8.28$, $P<0.05$). Es importante remarcar que los machos 3xTgAD muestran peor ejecución de la tarea de aprendizaje que el grupo NTg el primer día (ANOVA “2 “genotipo” x 2 “tratamiento””, efecto “genotipo”: $F_{1,27}=6.78$, $P<0.05$; ver también prueba *post-hoc* de Duncan; Fig. 5.41.A).

La Figura 5.41.B muestra las distancias recorridas en el MWM, ensayo por ensayo, en los 4 grupos de machos de 15 meses de edad. Los resultados de los

MANOVA realizados día por día, indican que existe un efecto ensayo, es decir, los animales muestran una mejora de la curva de aprendizaje, los días 1 y 2, y una tendencia el día 3 (MANOVA “4 “ensayo” x 2 “genotipo” x 2 “tratamiento””, efecto “ensayo”: día 1, $F_{3,81}=7.71$, $P<0.001$; día 2, $F_{3,81}=3.57$, $P<0.05$; día 3, $F_{2,96,79.89}=2.61$, $P=0.058$). Asimismo, los resultados indican que los machos 3xTgAD muestran una curva de aprendizaje empeorada respecto al grupo NTg el día 1 (MANOVA efecto “genotipo”: $F_{1,27}=6.78$, $P<0.05$). En el segundo día aparece una interacción “genotipo x tratamiento x ensayo” (MANOVA: $F_{3,81}=4.34$, $P<0.05$; Fig. 5.41.B), y el cuarto día un efecto “tratamiento” (MANOVA “4 “ensayo” x 2 “genotipo” x 2 “tratamiento””, efecto “tratamiento”: $F_{1,26}=4.74$, $P<0.05$; Fig. 5.41B), que son efectos mucho más dudosos en cuanto a su interpretación por depender de la ejecución en los días anteriores.

A)



B)

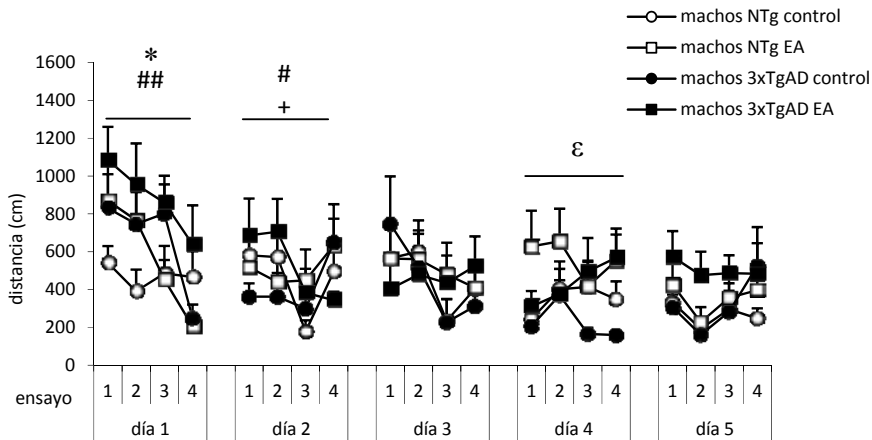


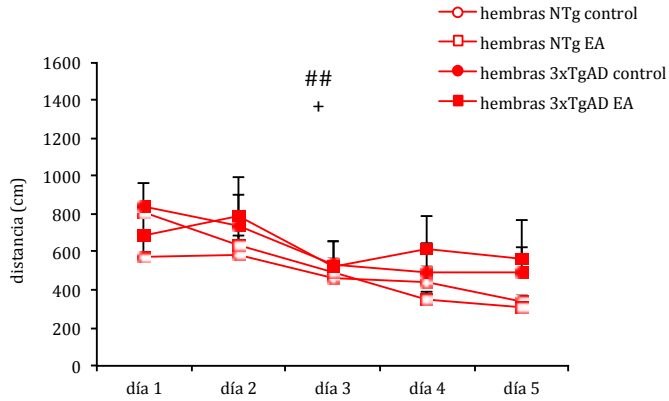
Figura 5.41.- Adquisición de la tarea de aprendizaje espacial en el MWM a partir de: **A)** las distancias medias diarias, y **B)** distancias ensayo por ensayo, de machos, NTg y 3xTgAD, controles y enriquecidos, de 15 meses de edad ($n=7-9$ por grupo). Los resultados se expresan como media \pm error estándar. * $P<0.05$ efecto "genotipo", ## $P<0.001$ y # $P<0.05$ efecto "día"/"ensayo", α $P<0.001$ efecto "genotipo x día"; ϵ $P<0.05$ efecto "tratamiento", + $P<0.05$ efecto "genotipo x tratamiento x ensayo". En "A)" Prueba post-hoc de Duncan en los resultados del día 1.

Tarea de aprendizaje/memoria espacial en hembras

En el caso de las hembras (ver Fig. 5.42.A), cuando se analizan las distancias medias diarias recorridas por los 4 grupos de 15 meses de edad, los resultados del MANOVA (“5 “día” x 2 “genotipo” x 2 “tratamiento””) indican que existe un aprendizaje por parte de los 4 grupos a lo largo del entrenamiento (efecto “día”: $F_{4,140}=14.47$, $P<0.001$), que se hace asintótico los días 4-5. El análisis también muestra que las hembras NTg enriquecidas, el primer día recorren una mayor distancia que su grupo homólogo no enriquecido, igualándose en distancias recorridas el resto de los días. Mientras que en el caso de las hembras 3xTgAD que, globalmente, muestran una curva de aprendizaje empeorada respecto al grupo NTg, el grupo de enriquecidas empieza con una mejor ejecución de la tarea que su grupo homólogo no enriquecido el primer día, mientras que los siguientes días se igualan ambos grupos (MANOVA efecto “genotipo x tratamiento x día”: $F_{4,140}=2.57$, $P\leq 0.05$; Fig. 5.42A).

Cuando se analizan más detalladamente, ensayo por ensayo, los resultados de la curva de aprendizaje de las hembras a lo largo de los 5 días (ver Fig. 5.42.B), el MANOVA indica una mejora de la ejecución de la tarea a lo largo de los 4 ensayos diarios en los días 1 y 2 (efecto “ensayo”: $F_{3,105}=6.38$, $P\leq 0.001$; $F_{3,105}=2.93$, $P<0.05$, respectivamente). El MANOVA de los resultados de las distancias recorridas el día 1 señala un efecto “genotipo x tratamiento x ensayo” ($F_{3,105}=5.13$, $P<0.05$; Fig. 5.42.B).

A)



B)

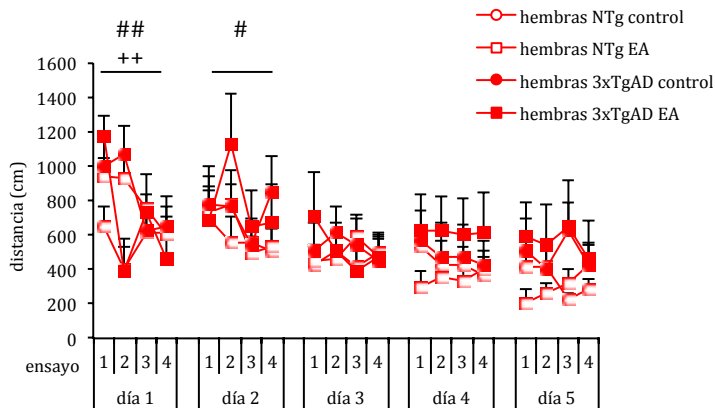


Figura 5.42. - Adquisición de la tarea de aprendizaje espacial en el MWM a partir de: **A)** las distancias medias diarias, y **B)** distancias ensayo por ensayo, de hembras, NTg y 3xTgAD, controles y enriquecidos, de 15 meses de edad (n=7-12 por grupo). Los resultados se expresan como media \pm error estándar. ## $P < 0.001$ y # $P < 0.05$, efecto "día"/"ensayo", + $P < 0.05$ y ++ $P < 0.001$ efecto "genotipo x tratamiento x ensayo".

Sesión de memoria sin plataforma a la 1h30

En la Tabla 5.7. se indican los resultados obtenidos en la prueba de memoria sin plataforma (“*Probe test*” o “*Removal 1h30*”) de los 8 grupos de 15 meses de edad. Las variables obtenidas fueron la “distancia recorrida hasta realizar el primer cruce del anillo” (“*a.c.*”, del inglés “*annulus crossings*”), el “número total de cruces del anillo” en el cuadrante P (donde se encontraba la plataforma en la anterior tarea de aprendizaje espacial de referencia), la preferencia por el cuadrante P (obtenida a partir del “porcentaje de distancia recorrida en el cuadrante P respecto a la distancia total” recorrida en los 4 cuadrantes) y, por último, la velocidad media de natación de cada grupo.

Cuando analizamos los resultados de machos y hembras conjuntamente, encontramos que el ANOVA “2 “sexo” x 2 “genotipo” x 2 “tratamiento”” indica que existen diferencias entre sexos en cuanto a la “velocidad de natación” (efecto “sexo”: $F_{1,59}=8.82$, $P<0.005$) y en la “distancia hasta realizar el primer a.c.” (efecto “sexo”: $F_{1,59}=4.24$, $P<0.05$). Así, las hembras presentan mayores velocidades de natación que los machos, y recorren mayores distancias hasta realizar el primer cruce del anillo, lo que reflejaría una peor memoria que los machos.

Asimismo, los ratones 3xTgAD muestran mayores velocidades de natación que los NTg (ANOVA efecto “genotipo”: $F_{1,59}=4.42$, $P<0.05$), y los animales enriquecidos muestran “velocidades medias de natación” en general menores que el grupo no tratado (ANOVA efecto “tratamiento”: $F_{1,59}=4.48$, $P<0.05$). Existe, a su vez, una interacción “genotipo x sexo” (ANOVA: $F_{1,59}=4.19$, $P<0.05$), indicando que las hembras 3xTgAD presentan una velocidad de natación superior a las NTg, mientras que en el caso de los machos tal diferencia entre genotipos no es tan evidente.

	Machos de 15 meses			
	NTg		3xTgAD	
	controles n=9	EA n=8	controles n=6	EA n=7
distancia recorrida hasta el 1r a.c.	246.01 ± 82.04	320.83 ± 75.67	328.69 ± 82.03	223.75 ± 55.23
n° total de a.c. en el cuadrante P	5.00 ± 1.01	4.13 ± 1,03	7.00 ± 1,37	4,00 ± 1.32
% distancia recorrida en P respecto al total	43.00 ± 4.70	39.69 ± 6.50	54.87 ± 7.74	52.94 ± 7.48
velocidad media de natación $\epsilon\epsilon$	21.96 ± 0.77	20.41 ± 0,74	23.66 ± 0.72	18.22 ± 2.06

	Hembras de 15 meses			
	NTg		3xTgAD	
	controles n=10	EA n=11	controles n=8	EA n=7
distancia recorrida hasta el 1r a.c. **	286.16 ± 54.03	337.12 ± 103.74	572.09 ± 188.16	625.29 ± 191.87
n° total de a.c. en el cuadrante P	5.20 ± 0,84	5,00 ± 0.49	4.88 ± 0.61	4.83 ± 1.11
% distancia recorrida en P respecto al total	43.04 ± 4.33	43.06 ± 4.47	40.09 ± 4.29	40.72 ± 5.69
velocidad media de natación **	19.94 ± 0.76	21.65 ± 0.72	25.39 ± 1.23	24.16 ± 1.64

Tabla 5.7.- Sesión de memoria sin plataforma (“Probe test”) en el MWM de machos y hembras de 15 meses de edad. Los resultados se representan como media ± error estándar. $\epsilon\epsilon$ $P \leq 0.005$ efecto “tratamiento”, ** $P \leq 0.001$ efecto “genotipo”. En sombreado se resaltan las variables donde encontramos diferencias entre grupos.

Cuando analizamos ambos sexos de manera independiente, los resultados del ANOVA en machos indican únicamente diferencias entre grupos en cuanto a la “velocidad de natación”, siendo los machos enriquecidos los que presentan una velocidad menor que los no tratados (ANOVA “2 “genotipo” x 2 “tratamiento”, efecto “tratamiento”: $F_{1,26}=9.57$, $P \leq 0.005$; ver Tabla 5.7). Para el resto de variables, el ANOVA no muestra diferencias estadísticamente significativas entre grupos.

En el caso de las hembras, sin embargo, los resultados de los ANOVAs muestran diferencias estadísticamente significativas entre genotipos en el caso de la “distancia recorrida hasta realizar el primer a.c.” (ANOVA efecto “genotipo”, $F_{1,35}=4.62$, $P<0.05$; Tabla 5.7), así como en la “velocidad media de natación” (ANOVA “2 “genotipo” x 2 “tratamiento”, efecto “genotipo”: $F_{1,35}=14.82$, $P\leq 0.001$; Tabla 5.7). En este caso, el grupo de hembras 3xTgAD presentan mayores distancias recorridas hasta cruzar el anillo donde se encontraba la plataforma (reflejando la peor memoria del grupo 3xTgAD), además de mostrar velocidades de natación mayores que las de las hembras NTg.

Debido a que el patrón que muestran los animales en el RM 1h30 a los 12 y 15 meses va en la misma dirección, y con el objetivo de observar más claramente la peor memoria que muestran los animales 3xTgAD, globalmente, respecto a los NTg, construimos la variable “media de distancias recorridas hasta realizar el 1er a.c. a los 12 y 15 meses” (valor medio de dicha variable a ambas edades). Así, como se ilustra en la Figura 5.43., el ANOVA “2 “genotipo” x 2 “tratamiento” x 2 “sexo”” señala que los ratones 3xTgAD recorren más “distancia hasta realizar el primer a.c.” que el grupo NTg (ANOVA efecto “genotipo”: $F_{1,59}=3.56$; $P<0.05$). De nuevo, este efecto es más evidente en hembras (ANOVA “2 “genotipo” x 2 “tratamiento””, efecto “genotipo”: $F_{1,35}=5.63$; $P<0.05$). Estos resultados indican que el patrón que muestran los ratones 3xTgAD (mostrando peor memoria que los NTg) a los 15 meses, se hace más evidente juntando las dos edades.

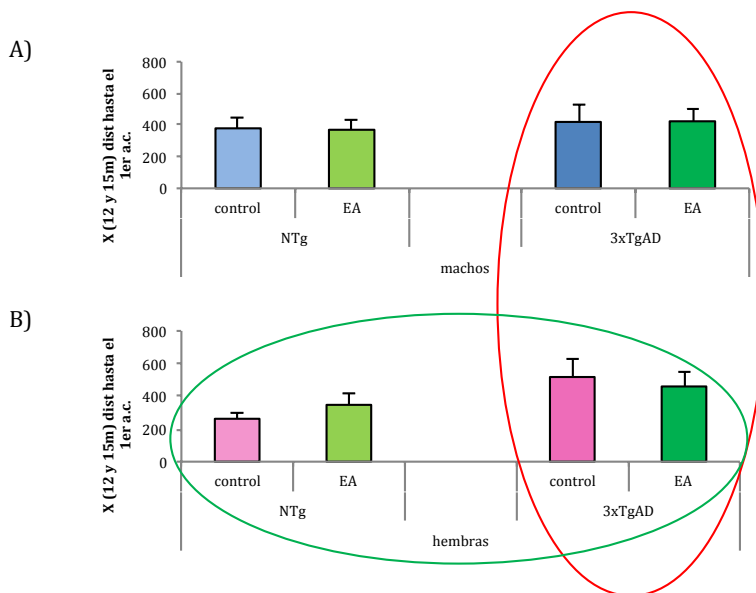


Figura 5.43.- Diferencia entre genotipos, especialmente marcada en hembras, en cuanto a la memoria a largo plazo en la prueba de memoria sin plataforma observada a partir de la “distancia media –de los 12 y 15 meses- recorrida hasta realizar el primer cruce del anillo”. El círculo rojo señala la mayor distancia (peor memoria) que recorren los animales 3xTgAD respecto a los NTg (efecto “genotipo” global, del ANOVA con los dos sexos). El círculo verde señala la diferencia entre genotipos observada en hembras (efecto “genotipo” en hembras).

Prueba de “emparejamiento retardado -15s- a una posición” (“15s-Delayed matching-to-place”, DMP-15s)

La Figura 5.44. muestra los resultados obtenidos al calcular la diferencia entre la distancia media recorrida en el primer ensayo de la tarea (durante los 4 días) de DMP-15s y la distancia media recorrida en el segundo ensayo. La Figura 5.44. representa los resultados de machos (a la izquierda de la gráfica) y hembras (a la derecha de la gráfica), entendida como “memoria de trabajo” al haber transcurrido 15s de diferencia entre los 2 ensayos. De este modo, los resultados del análisis de los dos sexos conjuntamente indican que no existen

diferencias estadísticas significativas entre grupos. Tampoco existen efectos significativos si se analizan ambos sexos por separado (Fig. 5.44).

Como análisis complementario, y siguiendo la lógica descrita a los 12 meses de edad, analizamos los datos de ambos sexos por separado debido a las diferencias entre géneros que se observan de manera consistente en las diversas tareas de aprendizaje y memoria. Así, en los resultados obtenidos en machos de 15 meses de edad, el ANOVA “2 “genotipo” x 2 “tratamiento”” nos indica que no observamos diferencias estadísticamente significativas entre grupos; mientras que al analizar la evolución de esta variable de los 12 a los 15 meses de edad mediante una MANOVA “2 “edad” x 2 “genotipo” x 2 “tratamiento””, observamos que hay un efecto del “genotipo” ($F_{1,26}=5.05$, $P<0.05$), indicando que los machos 3xTgAD muestran una peor memoria de trabajo que los NTg, al ser menor la diferencia en distancias recorridas entre el 1er y 2º ensayo.

En el caso de las hembras, los resultados del ANOVA no muestran diferencias estadísticamente significativas entre grupos, mientras que cuando analizamos la evolución de los 12 a los 15 meses de edad para esta variable, el MANOVA “2 “edad” x 2 “genotipo” x 2 “tratamiento”” de los resultados nos señala que hay un efecto de la “edad” sobre esta variable ($F_{1,35}=9.49$, $P<0.005$), siendo mayores la diferencias entre las distancias a los 15 que a los 12 meses de edad y, por tanto, mostrando un efecto de la memoria a largo plazo por parte de las hembras, que ya habían pasado por este test anteriormente; observamos también un efecto “edad x genotipo x tratamiento” ($F_{1,35}=4.99$, $P<0.05$) que explica como el tratamiento de EA, mientras que a los 12 meses producía una mejora en la memoria de trabajo especialmente sobre las hembras 3xTgAD (ver Fig. 5.30.), a los 15 meses de edad, lo hace especialmente sobre el grupo NTg.

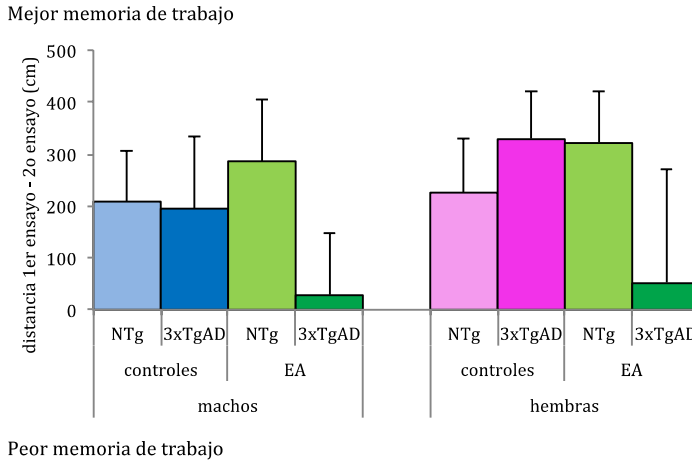


Figura 5.44.- Diferencia entre la distancia media (obtenida a partir de los 4 días) recorrida en el primer ensayo de la tarea de 15s de “Delayed matching-to-place” y la distancia media recorrida en el segundo ensayo 15s después ($n=7-12$ por grupo). Los resultados se expresan como media \pm error estándar. $P<0.005$ Efecto “edad”.

Siguiendo la lógica aplicada para el análisis de los datos a los 12 meses de edad, en la Figura 5.45. analizamos las distancias medias diarias recorridas durante los 4 días de test (obtenidas a partir de la media de los 2 ensayos diarios) por los 8 grupos de ratones. Así, los resultados del MANOVA “4 “día” x 2 “sexo” x 2 “genotipo” x 2 “tratamiento”” señalan que todos los grupos muestran una mejora de la ejecución de la tarea a lo largo de los días (MANOVA efecto “día”: $F_{3,180}=21.739$, $P<0.001$). Asimismo, los resultados también indican que los animales 3xTgAD muestran, teniendo en cuenta el global de los 4 días, una peor progresión (aprendizaje) en la tarea que los NTg (MANOVA efecto “genotipo”: $F_{1,60}=14.46$, $P<0.001$).

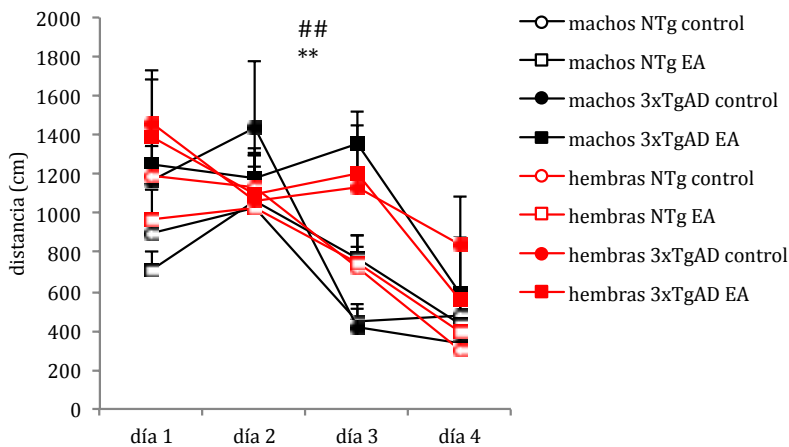
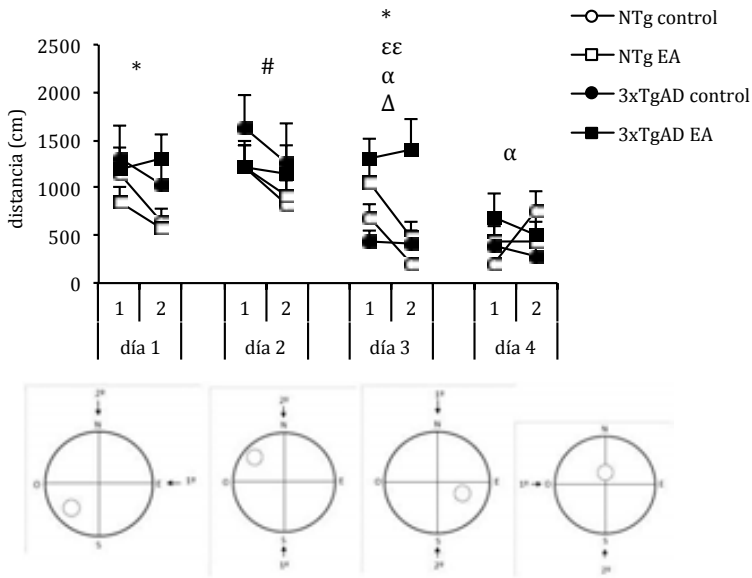


Figura 5.45.- Distancia media recorrida diariamente en la tarea de DMP-15s por machos y hembras, NTg y 3xTgAD, controles y con EA, de 15 meses de edad (n=7-12 por grupo). Los resultados se expresan como media \pm error estándar. ## $P < 0.001$ efecto "día", ** $P < 0.001$ efecto "genotipo".

Prueba de DMP-15s en machos

La Figura 5.46. muestra las distancias recorridas ensayo por ensayo a lo largo de los 4 días de tarea (Fig. 5.46.A), y las distancias medias (obtenidas a partir de los 4 días de test) recorridas en el primer y segundo ensayo (Fig. 5.46.B). Tal y como observamos en la Fig. 5.46.B, el MANOVA "2 "ensayo" x 2 "genotipo" x 2 "tratamiento" de los resultados indica que los 4 grupos de machos presentan una mejoría en cuanto a distancias recorridas en el segundo ensayo respecto al primero, indicando por tanto un efecto de la memoria de trabajo (MANOVA efecto "ensayo": $F_{1,26}=9.20$, $P \leq 0.005$). Además, el grupo de ratones 3xTgAD realiza una peor ejecución de la tarea que los animales NTg (MANOVA efecto "genotipo": $F_{1,26}=7.03$, $P < 0.05$. Ver también ANOVA del 2º ensayo en Fig. 5.46.B, efecto "genotipo": $F_{1,26}=7.14$, $P < 0.05$).

A)



B)

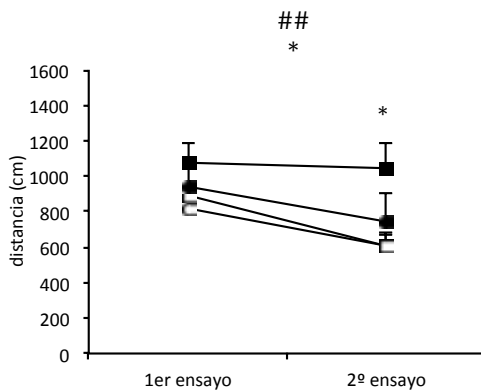
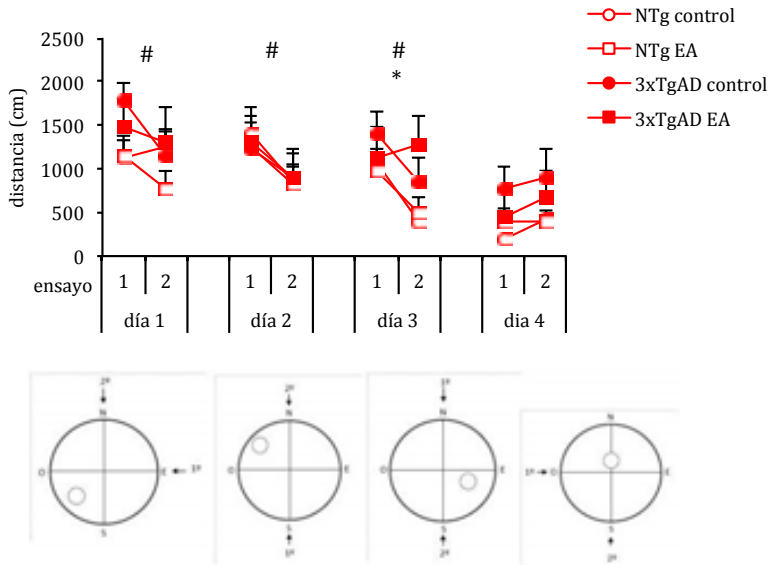


Figura 5.46.- Distancias medias recorridas ensayo por ensayo a lo largo de los 4 días de entrenamiento (A) y distancias medias de los 4 días, recorridas en el 1er y 2o ensayo (B) en la tarea de DMP-15s, por machos de 15 meses de edad (n=7-9 por grupo). Los resultados se representan como media \pm error estándar. * $P < 0.05$ efecto "genotipo", $\epsilon\epsilon$ $P < 0.005$ efecto "tratamiento", # $P < 0.05$ y ## $P \leq 0.005$ efecto "ensayo", α $P < 0.05$ "genotipo x ensayo", Δ $P < 0.05$ efecto "genotipo x tratamiento".

Prueba de DMP-15s en hembras

En la Figura 5.47. analizamos las distancias medias recorridas ensayo por ensayo a lo largo de los 4 días de entrenamiento (Fig. 5.47.A) y las distancias medias (obtenidas a partir de los 4 días de test) recorridas en el primer y segundo ensayo (Fig. 5.47.B) de la tarea de DMP-15s. Tal y como observamos en la Fig. 5.47.B, el análisis de los resultados indica que los 4 grupos de hembras de 15 meses muestran una tendencia a mejorar la ejecución de la tarea en el 2º ensayo, es decir, el MANOVA “2 “ensayo” x 2 “genotipo” x 2 “tratamiento”” indica que existe un efecto de la memoria de trabajo (MANOVA efecto “ensayo”: $F_{1,35}=13.79$, $P\leq 0.001$). Tal como sucedía en machos, también observamos que las hembras 3xTgAD muestran peor memoria de trabajo que las NTg (MANOVA efecto “genotipo”: $F_{1,35}=6.31$, $P<0.05$. Ver también ANOVA 2º ensayo, efecto “genotipo”: $F_{1,35}=5.12$, $P<0.05$).

A)



B)

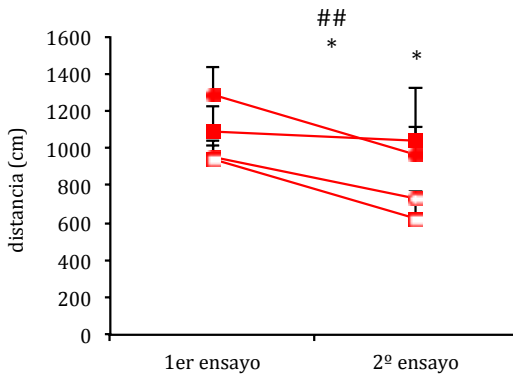


Figura 5.47.- Distancias medias recorridas ensayo por ensayo a lo largo de los 4 días de entrenamiento (A) y distancias medias recorridas en el primer y segundo ensayo (medias obtenidas a partir de los 4 días de entrenamiento) (B) en la tarea de DMP-15s, por hembras de 15 meses de edad (n=7-12 por grupo). Los resultados se representan como media \pm error estándar. # $P < 0.05$ y ## $P \leq 0.001$ efecto "ensayo", * $P < 0.05$ efecto "genotipo".

Aprendizaje guiado por señales locales

Para comprobar que las habilidades visuales, motoras y aspectos motivacionales de los animales en la piscina de Morris siguen intactos, se volvieron a testar los ratones en la prueba de aprendizaje guiado por señales (*"Cue task"*).

Así, en el caso de los machos, los resultados del MANOVA "2 "genotipo" x 2 "tratamiento" mostraron que los 4 grupos de ratones de 15 meses de edad conservan capacidades motoras, visuales y motivacionales similares, pues no hay diferencias estadísticas entre grupos en las distancias recorridas hasta hallar la plataforma señalada con la bandera (MANOVA "4 "ensayo" x 2 "genotipo" x 2 "tratamiento", efecto "ensayo": $F_{25.5,63.76}=3.84$, $P<0.05$; Fig. 5.48.A).

En el caso de las hembras, contrariamente a lo que esperábamos, observamos que los resultados del MANOVA "4 "ensayo" x 2 "genotipo" x 2 "tratamiento" indican una cierta alteración en los grupos 3xTgAD, que muestra mayores distancias recorridas que los NTg (MANOVA efecto "genotipo": $F_{1,34}=7.62$ $P<0.05$; Fig. 5.48.B).

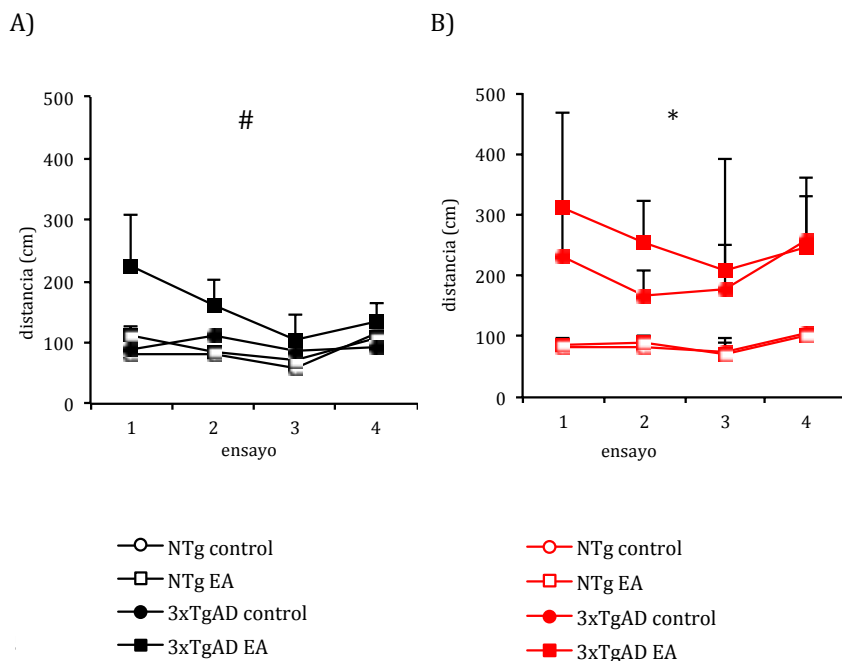


Figura 5.48.- Aprendizaje guiado por señales locales en machos **(A)** y hembras **(B)** de 15 meses de edad en la piscina de Morris con plataforma señalada por una bandera ($n=7-12$ por grupo). Los resultados se representan como media \pm error estándar. # $P<0.05$ efecto “ensayo”, * $P<0.05$ efecto “genotipo”.

5.2.2.4. Curva de supervivencia

La siguiente Figura 5.49. muestra la curva de supervivencia de los 8 grupos de ratones que pasaron por la batería de pruebas conductuales hasta los 16 meses de edad, momento en el que fueron sacrificados para la obtención de muestras biológicas (utilizadas para otros estudios complementarios; p.ej. Giménez-Llort *et al.*, 2011). Como se observa en la gráfica, tanto las hembras como los machos 3xTgAD no tratados son los primeros en mostrar un declive de la supervivencia en los estadios iniciales de la enfermedad, concretamente a los 7-8 meses de edad.

Por lo que respecta a los grupos de machos y hembras NTg, tanto los no tratados como los enriquecidos muestran una supervivencia del 100% hasta el momento del sacrificio a los 16 meses de edad. En resumen, solamente en el caso de los animales 3xTgAD la supervivencia no es del 100% al llegar al final de la fase experimental a los 16 meses de edad ($\chi^2=5.22$, $P<0.05$, Fisher $P=0.02$), presentando una mortalidad del 40% los machos (incluyendo los ratones tratados con EA y controles, $\chi^2=7.32$, $P<0.05$, Fisher $P=0.005$) y un 25% las hembras (incluyendo el grupo control y el enriquecido, $\chi^2=3.84$, $P<0.05$, Fisher $P=0.02$).

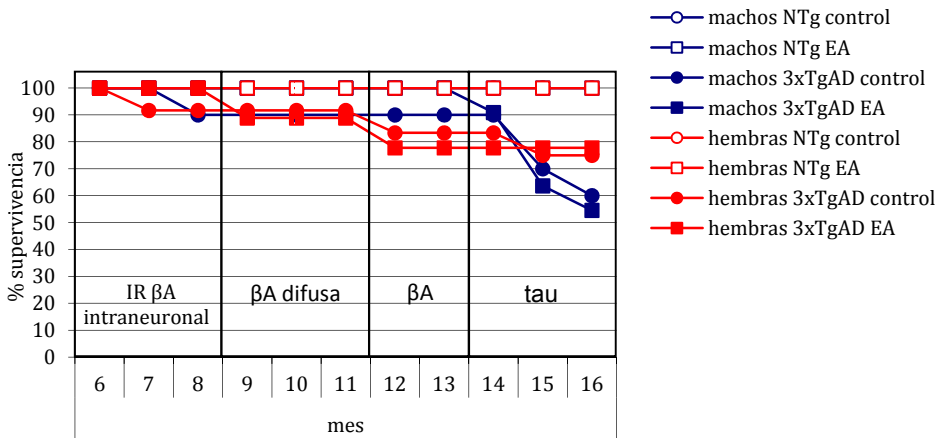


Figura 5.49.- Curva de supervivencia de machos y hembras NTg y 3xTgAD, no tratados y con EA, hasta los 16 meses de edad ($n=8-12$ por grupo). Los resultados se expresan como porcentaje de animales supervivientes para cada edad. Existe un efecto significativo del "genotipo" (ver texto arriba), con $\chi^2=5.22$, $P<0.05$.

5.3. DISCUSIÓN ESTUDIO II

El presente Estudio II consta de un experimento longitudinal complejo, en el que se evalúan, **i)** las diferencias en las funciones cognitivas y emocionales (BPSD) entre los ratones 3xTgAD y los NTg, de ambos sexos, a los 12 y posteriormente a los 15 meses de edad; y **ii)** los efectos, presumiblemente beneficiosos, del tratamiento de EA en los ratones 3xTgAD, a los 12 y 15 meses. Los resultados principales se ven resumidos en las Tablas 5.8. y 5.9., ver pág. 222 y 238).

Debido a que los pacientes con AD no inician los tratamientos para combatir la enfermedad hasta que ésta es diagnosticada, es decir, cuando aparecen las primeras alteraciones conductuales/cognitivas, la administración del tratamiento de EA en el modelo 3xTgAD también se llevó a cabo cuando los animales mostraban la sintomatología típica de las etapas de diagnóstico del AD en pacientes, a pesar de intuirse su mayor efectividad si fuese aplicado en estadios tempranos del AD. Así, en este Estudio II, el tratamiento de EA se inició a los 6 meses de edad de los animales, edad en que los ratones 3xTgAD muestran déficits cognitivos (ver Estudio I, Billings *et al.*, 2005) y alteraciones de tipo no cognitivo (o BPSD; ver Estudio I), además de presentar inmunoreactividad a la β A intraneuronal en el hipocampo y la corteza, y el inicio de la deposición extracelular de β A en la corteza (Oddo *et al.*, 2003a).

Tras finalizar el tratamiento de EA, de 5.5 meses de duración, los ratones de ambos genotipos fueron evaluados en cuanto a las funciones sensorio-motoras, el perfil emotivo (mediante el Test de las esquinas, el OF, la DLB y el HB) y las capacidades cognitivas (a través de MWM, principalmente) a los 12 y posteriormente a los 15 meses de edad. Como comentábamos en la Tabla 2.2. (ver pág. 31) de la introducción, los ratones 3xTgAD de 12 meses se caracterizan por la presencia de placas de β A ampliamente extendidas por la

corteza y el hipocampo, y el inicio de la formación de ovillos intraneuronales de Tau en el hipocampo. Mientras que, a los 15 meses, la neuropatología en los cerebros de los ratones 3xTgAD está más desarrollada, encontrando además de las placas amiloides, los ovillos neurofibrilares ampliamente extendidos por el hipocampo y la corteza (Oddo *et al.* 2003a).

De este modo, de manera genérica, los resultados obtenidos en el Estudio II indican que:

- En general, los efectos del genotipo son de mayor magnitud que los del enriquecimiento ambiental.
- El enriquecimiento ambiental presenta efectos positivos, aunque muy moderados, en el rendimiento memorístico de los ratones 3xTgAD. Además, muestra ciertos efectos paradójicos en emotividad y conducta de exploración.
- Existe un claro dimorfismo sexual en lo que hace referencia a las funciones cognitivas y emocionales (BPSD) de los ratones, que también se observa en los efectos del enriquecimiento ambiental.

5.3.1. Caracterización del perfil de conducta exploratoria y ansiosa en situaciones de novedad (BPSD), en ratones 3xTgAD de 12 y 15 meses

A continuación presentamos una tabla (Tabla 5.8.) resumen de los principales efectos, de genotipo, sexo y tratamiento, hallados en actividad exploratoria y ansiedad/temerosidad en situaciones de novedad, en los ratones 3xTgAD y NTg. Los animales fueron evaluados para dichos “BPSD” (*Behavioral and Psychological Symptoms of Dementia*) a los 12 y posteriormente a los 15 meses de edad, en la batería conductual llevada a cabo en el Estudio II. Dichos efectos serán explicados más detalladamente a continuación.

		Capacidades sensorio-motoras		Neofobia (Test de las esquinas)		Ansiedad (OF: lat. movimiento y def.)		Actividad exploratoria (OF: crossings y rearings)		Ansiedad (DLB: lat, nº y tiempo de entrada, y def.)		Inhibición conductual (HB: lat HD)		Conducta exploratoria (HB: HD y t.)	
		♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
12 meses	G	si	si	si	no	si	si	si	no	si	si, defecaciones	no	no	si	no
				si (♂+♀)				si (♂+♀)		si (♂+♀)		si (♂+♀)			
	T	si	no	si, contrario en 3xtgAD	no	no	no	no	no	si, (sólo def.)	si, contrario en t blanco	no	no	no	no
S	no		si		si		si		si		no		si		
15 meses	G	si	si	si	si	si	si	no	no	-	-	-	-	-	-
	T	si, contrario	no	si, contrario	no	no	no	no	no	-	-	-	-	-	-
	S	no		no		no		no		-		-		-	

Tabla 5.8.- Resumen de los efectos de “genotipo” (G), “tratamiento” (T), y “sexo” (S) encontrados en las diversas pruebas de la batería conductual diseñada para evaluar actividad exploratoria y ansiedad en los ratones de 12 y 15 meses de edad. En sombreado se sobresaltan los efectos encontrados. “♂+♀” Resultados obtenidos cuando se analizan ambos sexos conjuntamente, “-” Animales no testados en dicha prueba. Abreviaturas: “lat. movimiento”: latencia de movimiento, “def.”: número de defecaciones, “HD”: Número de “Head dips” (o “exploraciones de los agujeros”), “t”: tiempo de “head dipping” (o “tiempo acumulado explorando los agujeros”).

5.3.1.1. Funciones sensorio-motoras y peso corporal

Para evaluar las capacidades sensorio-motoras de los ratones 3xTgAD, con el fin de eliminar posibles artefactos en la interpretación de los resultados obtenidos en el resto de pruebas de la batería conductual, los animales fueron testados en una serie de pruebas sensorio-motoras validadas en nuestro laboratorio y otros (Escorihuela *et al.*, 1995b; Giménez-Llort *et al.*, 2002).

Lo más importante de los resultados de nuestro estudio es que demuestran que, tanto a los 12 como a los 15 meses de edad, los animales 3xTgAD no presentan ningún tipo de déficit en las capacidades sensorio-motoras respecto a los animales NTg mostrando incluso (en algunas de las pruebas) mayor resistencia a la caída que el grupo NTg. Resultados similares ya han sido observados en otros estudios tanto en nuestra colonia de ratones (Cañete, 2011; García-Mesa *et al.*, 2011; Giménez-Llort *et al.*, 2007, 2010) y en otras colonias de 3xTgAD (Sterniczuk *et al.*, 2010). Las capacidades visuales de los ratones 3xTgAD también se muestran intactas en ambas edades.

A pesar de que las capacidades sensorio-motoras de machos y hembras van en la misma dirección, comentada arriba, existe un efecto del tratamiento de enriquecimiento ambiental (EA) que difiere en función del sexo, presentándose exclusivamente en machos. Así, observamos que en los ratones macho de 12 y 15 meses el EA disminuye las latencias de caída en los test de las barras metálica, de hierro y la percha metálica, disminuye el número de extremidades con las que se sujetan a la percha metálica en el test de 60 segundos (a los 12 meses) y el número de segmentos en el test de la percha de 5 segundos (a los 15 meses de edad).

Para comprender la peor ejecución de las pruebas sensorio-motoras de los machos enriquecidos en las 2 edades, en las que particularmente muestran menores latencias de caída en las tres pruebas comentadas, podemos descartar

el efecto del aumento de peso de los machos enriquecidos (ver debajo), ya que dicho incremento sólo se observa en ratones de 15 meses, y sin embargo la peor ejecución en las tareas de las barras sensorio-motoras se produce en ambas edades. Sabemos, por otra parte, que los machos enriquecidos no sufren problemas motores importantes, precisamente porque en la prueba de aprendizaje guiado por señales (CUE) a los 12 meses no encontramos diferencias entre los animales tratados y los no tratados (Fig. 5.33.), e incluso en la *Place task* a los 15 meses recorren mayores distancias que los animales no tratados (Fig. 5.41.A).

Por otra parte, también encontramos diferencias de peso entre genotipos, indicando que los machos 3xTgAD pesan más que los animales NTg, mientras que en hembras, en discordancia con los resultados de Giménez-Llort *et al.* (2007), no encontramos estas diferencias. Observamos así uno de los casos de dimorfismo sexual que vamos a ir encontrando en los diversos test y medidas de la batería conductual.

Asimismo, observamos que los machos no enriquecidos de 15 meses, en especial los 3xTgAD, han disminuido su peso respecto a los 12 meses, mientras que los ratones tratados con EA mantienen su peso. Esto es especialmente evidente en animales 3xTgAD enriquecidos, en los que incluso se ha incrementado el peso entre los 12 y los 15 meses (ver Tabla 5.6.). La disminución del peso de los animales 3xTgAD (no tratados) con la edad, sigue la línea que observamos en la literatura o inclusive en la propia enfermedad de Alzheimer, donde las perturbaciones psicomotoras y en los patrones de ingesta de los alimentos están asociadas con medidas de deterioro cognitivo y funcional, así como una disminución del peso corporal (Greenwood *et al.*, 2005). Hay que decir que, en modelos animales para la enfermedad de AD, encontramos toda una serie de resultados controvertidos, desde los que mimetizan las observaciones clínicas del AD (Lalonde *et al.*, 2002) hasta los que no encuentran ninguna diferencia de peso, o pesos superiores de los

animales transgénicos respecto a sus controles (Lalonde *et al.*, 2003a y 2003b). Estas discrepancias, halladas en los distintos modelos de AD, probablemente no sólo dependan del tipo de mutación, sino también de la edad o etapa neurológica en que se encuentra el animal.

En cuanto al modelo 3xTgAD, Cañete (2011), García-Mesa *et al.* (2011) y Giménez-Llort *et al.* (2010) también encuentran efectos de dimorfismo sexual en 3xTgAD a diversas edades, indicando un mayor peso de las hembras frente a los machos. Y, dependiendo del tipo de tratamiento ambiental aplicado, se han observado incrementos (por ej. Cañete, 2011) o disminuciones (por ej. García-Mesa *et al.*, 2011) del peso de estos animales.

5.3.1.2. Efectos del genotipo en conducta de ansiedad/temerosidad, inhibición conductual y “curiosidad” (búsqueda de novedad)

Para valorar estos aspectos en los animales 3xTgAD, y los posibles efectos del tratamiento de EA, se utilizaron el Test de neofobia de las esquinas, el test de Campo abierto (o *Open field*, OF), la Caja blanca-y-negra (o *Dark-light box*, DLB) y el test de la Tabla de agujeros (o *Hole board*, HB). A los 15 meses solamente se administraron el Test de las esquinas y el del Campo abierto.

El Test de neofobia de las esquinas, nos indica temor por lugares o elementos nuevos (aunque la novedad/aversividad es mínima), y tanto en el Estudio I como en otros trabajos, ya se han observado resultados similares en esta cepa de ratones 3xTgAD a partir de los 2.5 meses de edad (ver Estudio I, Cañete, 2011; España *et al.*, 2009; García-Mesa *et al.*, 2011; Giménez-Llort *et al.*, 2007). De hecho, el incremento en la conducta inhibitoria que presentan los animales

3xTgAD es una característica muy común a muchos ratones transgénicos de APP descritos en la literatura (Janus y Westway, 2001).

Por otra parte, la actividad en el Campo abierto (OF) es considerada como un índice de actividad motora/exploratoria influida por componentes emocionales de reactividad ante la mayor novedad y aversividad de la situación, de tal forma que la conducta exploratoria en el test del OF se asume que depende en gran parte de la neofobia que el sujeto experimenta (Broadhurst, 1975; Crawley, 1985; DeFries *et al.*, 1970; Denenberg, 1969; Streng, 1971). La “latencia de movimiento inicial”, la deambulación (nº de cruces o actividad horizontal), los “levantamientos” verticales (*Rearings* en inglés) y las defecaciones, son conductas/respuestas presumiblemente relacionadas con la inhibición/ desinhibición conductual y la temerosidad en este test.

Otra de las pruebas que nos permite evaluar conductas emotivas o ansiedad es la Caja blanca-y-negra (DLB). Esta prueba, basada en la preferencia innata de los roedores por lugares oscuros y la aversión por los iluminados, es sensible a tratamientos con fármacos ansiolíticos (Belzung *et al.*, 2000; Crawley *et al.*, 1997; Griebel *et al.*, 2000). Así, se consideran buenos indicadores de la conducta ansiosa en el test, la “latencia de entrada al compartimento blanco/iluminado”, el “número de entradas” y el “tiempo pasado en el compartimento blanco” (Yuk *et al.*, 2009).

Por último, el test de la Tabla de agujeros (*Hole-Board*, HB) es una prueba que mide la curiosidad del animal aprovechando la tendencia natural de los ratones a explorar los agujeros del suelo, en especial si se colocan objetos desconocidos bajo los mismos. Este test, también se halla influido por un componente de reactividad emocional o temerosidad, debido a la novedad de la situación (Barbier *et al.*, 1991; File y Wardill, 1975).

Una visión general de los resultados del presente estudio indica que, observando conjuntamente los efectos principales a los 12 y 15 meses de edad, los ratones 3xTgAD presentan, globalmente, mayores signos de temerosidad y/o inhibición conductual (ansiedad) frente a la novedad tanto en el Test de las esquinas como en el Campo abierto (ver Tabla 5.8.). Así lo indican el menor “número de levantamientos” (exploración vertical) en el Test de las esquinas, la mayor “latencia de movimiento inicial” y “de entrada a la periferia” en el Campo abierto y el mayor “número de defecaciones” (sólo a los 12 meses de edad, en este caso) en este mismo test, que se observan en los ratones 3xTgAD respecto a los NTg. Un patrón similar se observa en las principales variables indicadoras de temerosidad/ansiedad en el test de la DLB, administrado sólo a los 12 meses, dado que los ratones transgénicos presentan, globalmente, mayores “latencias” (de entrada al compartimento blanco/iluminado), menor “número de entradas” y menor “tiempo en el compartimento iluminado” que los ratones controles no transgénicos. Asimismo, los animales 3xTgAD realizan mayor “número de defecaciones” que los NTg en este test.

Si a esas diferencias globales entre ambos genotipos sumamos el hecho de que los ratones transgénicos presentan, globalmente, una clara disminución de la conducta exploratoria horizontal (cruces) y vertical (levantamientos) en el test del Campo abierto a los 12 meses de edad (pero no a los 15 meses, debido a un efecto aparente de “habitación”), es plausible concluir que el modelo de ratón 3xTgAD presenta un evidente perfil de elevada temerosidad/ansiedad y/o de inhibición conductual marcada en situaciones de novedad (aversivas).

En línea con dicha inhibición conductual ante la novedad, es interesante destacar que, si bien los ratones 3xTgAD presentaron también una claramente incrementada “latencia de *head-dipping*” en el test HB, no aparecieron signos claros de inhibición durante el resto del test por lo que se refiere al “número de *head dips*” y al “tiempo de *head-dipping*”. Esto nos lleva a plantearnos que los ratones 3xTgAD no presentarían la mencionada inhibición conductual como

consecuencia de problemas motores importantes o por falta de “curiosidad” (o motivación por la exploración de espacios nuevos, agujeros, etc.), sino que dicha inhibición sería más bien genuinamente debida a una temerosidad o ansiedad incrementadas.

Abundando en lo anterior, y en apoyo de la idea de que los resultados obtenidos reflejan mayor temerosidad/ansiedad en los ratones transgénicos, cabe señalar los siguientes aspectos: **i)** no se han observado diferencias claras ni consistentes en actividad locomotora basal (medida en sus “cajas-hogar”) respecto a los ratones NTg en estas mismas edades (ver Cañete, 2011; Giménez-Llort *et al.*, 2007); **ii)** la velocidad superior de natación en el MWM (ver secciones posteriores y “Resultados” de las tareas de MWM) es también un argumento en contra de que la actividad basal de los 3xTgAD sea la responsable de los efectos hallados en los test de novedad aquí discutidos; **iii)** la conducta exploratoria horizontal en el test de Campo abierto a la edad de 15 meses no indica un déficit motor (o de actividad) en los ratones 3xTgAD.

Cabe señalar que, aunque al iniciar el presente trabajo (durante 2006) no existían aún datos con los test aquí utilizados, nuestros resultados, y la idea de que los ratones 3xTgAD presentan mayor inhibición conductual ante la novedad o son más temerosos/ansiosos que los NTg, son coherentes con trabajos ya publicados durante este último lustro y que tienden a sugerir que estos ratones transgénicos presentan un perfil de temerosidad incrementada (Cañete, 2011; España *et al.*, 2010; García-Mesa *et al.*, 2011; Giménez-Llort *et al.*, 2007, 2008 y 2010; Gulinello *et al.*, 2009; Pietropaolo *et al.*, 2008; Sterniczuk *et al.*, 2010). Dicho patrón de inhibición conductual (temerosidad) parece iniciarse, en estos transgénicos, a partir de aproximadamente los 2-3 meses de edad, dependiendo del test particular (“Estudio I” de la presente Tesis; Cañete 2011; Giménez-Llort *et al.* 2007). Esto puede ser relevante, puesto que la acumulación de β -amiloide intraneuronal se inicia en estos animales a los 3 meses de edad (Billings *et al.*, 2005, Oddo *et al.*, 2003a-b).

Cabe añadir que, algunos de los efectos del “genotipo” descritos en el punto anterior dependen del sexo de los animales, tal y como se muestra en la Tabla 5.8. De este modo, el dimorfismo sexual que se refleja en diversas variables indica que, globalmente, los machos muestran una mayor inhibición conductual frente a la novedad y/o un patrón conductual de temerosidad/ansiedad más marcado que las hembras. Dicho incremento en los niveles de inhibición conductual en machos respecto a las hembras, se puede observar claramente a los 12 meses de edad en el Test de las esquinas (donde realizan un menor “número de esquinas exploradas”) y en el Campo abierto (presentando mayor “latencia de llegada a la periferia”).

Asimismo, los resultados también nos indican que existen interacciones de diversas variables con el factor “sexo”, señalando que mientras los 4 grupos de hembras muestran patrones conductuales similares, en determinadas variables el efecto “genotipo” es detectable exclusivamente en machos. Así, en el Campo abierto y la Caja blanca-y-negra observamos que mientras en hembras no encontramos diferencias entre grupos, en machos vemos que el grupo 3xTgAD presenta mayor “latencia de movimiento” (OF) y menor “número de entradas al compartimento blanco/iluminado” (DLB) que los NTg. Dichos efectos remarcan, de nuevo, el patrón conductual de mayor temerosidad/ansiedad que muestran los machos frente a las hembras, y en especial el del grupo de machos 3xTgAD.

Por otro lado, los resultados también nos indican que la actividad exploratoria globalmente es menor en machos que en hembras. Así, en el Campo abierto, a los 12 meses, los machos presentan menor número de “cruces+levantamientos”, es decir, de actividad exploratoria total, que las hembras. Encontramos también, distinto efecto del “genotipo” sobre la actividad exploratoria en función del sexo, observando, nuevamente, diferencias más evidentes en machos que en hembras, en concordancia con los resultados de García-Mesa *et al.* (2011) obtenidos a los 7 meses en ratones

3xTgAD. En este caso, mientras que en hembras no encontramos diferencias entre grupos, en machos vemos que el grupo 3xTgAD realiza un menor “número de levantamientos” y de “cruces+levantamientos” totales (es decir, de actividad exploratoria total en el OF), y menor “tiempo de exploración de los agujeros” en el HB, que los NTg.

Cabe decir que, el dimorfismo sexual encontrado en el patrón de inhibición conductual de los animales 3xTgAD, que se observa de forma más pronunciada en machos, es en cierto modo paradójico. Los estudios sobre estos transgénicos señalan hacia una patología más agresiva en hembras 3xTgAD que en machos (Hirata-Fukae *et al.*, 2008; Nelson *et al.*, 2007; Pietropaolo *et al.*, 2008). Sin embargo, los niveles de corticosterona plasmática basal (reflejo del nivel de activación del eje HPA) en los animales de 15 meses de nuestro estudio (ver Fig. 5.50. más adelante) indican que, a pesar de que globalmente las hembras presenten mayores niveles de corticosterona plasmática que los machos (Arranz *et al.*, 2011; Clinton *et al.*, 2007), los machos 3xTgAD muestran mayores niveles de corticosterona respecto a los machos NTg (ver Fig. 5.50.), mientras que en hembras 3xTgAD no encontramos estas diferencias respecto a las NTg (Arranz *et al.*, 2011). Es decir, este hecho iría en relación a los efectos de dimorfismo sexual encontrados en nuestro estudio, donde globalmente observamos un perfil temeroso/ansioso en animales 3xTgAD, que en general se observa más pronunciadamente en machos que en hembras.

Existen pocos trabajos en ratones 3xTgAD que comparen ambos sexos, y además, la mayor parte están exclusivamente enfocados a los estudios de las alteraciones neuropatológicas y cognitivas de estos animales (Arranz *et al.*, 2011; Clinton *et al.*, 2007; Hirata-Fukae *et al.*, 2008; García-Mesa *et al.*, 2011). Este hecho nos lleva a tomar como referencia otros modelos transgénicos para el AD, en los que independientemente de los déficits cognitivos que presentan todos los modelos, el dimorfismo sexual que afecta a los patrones conductuales emocionales no va necesariamente en la misma dirección. Así, por ejemplo, en

el modelo APP23 las hembras transgénicas no difieren de las controles en niveles de ansiedad (Lalonde *et al.*, 2002), mientras que en el modelo Tg257 los animales de ambos sexos globalmente muestran una reducción en los niveles de ansiedad, simulando la pérdida de control de la inhibición que se da en pacientes con AD (Lalonde *et al.*, 2003a). En el caso del modelo TgCRND8 no se observan diferencias sexuales en los niveles de ansiedad, a pesar de que los niveles de corticosterona en machos transgénicos se ve incrementado desde edades muy tempranas respecto a los NTg, a diferencia de lo que ocurre en hembras (Touma *et al.*, 2004).

5.3.1.3. Efectos del enriquecimiento ambiental sobre la reactividad emocional y conducta exploratoria en situaciones de novedad

Por lo que respecta a los efectos del tratamiento de enriquecimiento ambiental (EA) en las variables de temerosidad/ansiedad, cabe decir que aparecen escasos efectos significativos y, además, son en cierto modo paradójicos. Así, parecería lógico que el EA disminuyese la temerosidad (Chapillon *et al.*, 2002; Escorihuela *et al.*, 1994b; Fernández-Teruel *et al.*, 1997; Larsson *et al.*, 2002) y/o reactividad emocional en ambientes nuevos (Roy *et al.*, 2001), y en este sentido iría la reducción global de las defecaciones que produce el tratamiento en el test de la DLB (Denenberg *et al.*, 1969; Walsh y Cummins, 1976). Sin embargo, es aventurado extraer conclusiones a partir de este resultado único, puesto que no se observa un efecto similar en el test de Campo abierto y que, por otra parte, el EA produce una disminución global del tiempo que los ratones pasan en la parte iluminada de la Caja blanca-y-negra (ver Fig 5.18. en “Resultados”). Por lo que respecta a la reducción del “número de defecaciones” que produce el EA en la DLB (pero no en el Campo abierto), en concordancia con el trabajo de Roy *et al.* (2001), es posible que el OF, al constar de una única

zona iluminada/aversiva genere más temerosidad en los ratones que la DLB, donde hay dos compartimentos, y en uno de ellos (el oscuro) los ratones se sienten seguros. Quizá por eso, los efectos que el EA produce en los ratones, los cuales son de carácter leve, sean visibles solamente en las defecaciones en el ambiente presumiblemente menos aversivo que constituye la DLB. El hecho de que en los mismos animales utilizados en el presente trabajo, cuando se realizaron análisis de corticosterona plasmática basal (ver Fig. 5.50.), se observase una disminución de los niveles de dicha hormona en los machos 3xTgAD que recibieron EA (Arranz *et al.*, 2011), indica que el tratamiento de EA puede tener efectos “anti-estrés” (o sobre el eje HPA) que, en cualquier caso, en nuestras pruebas conductuales no hemos podido detectar.

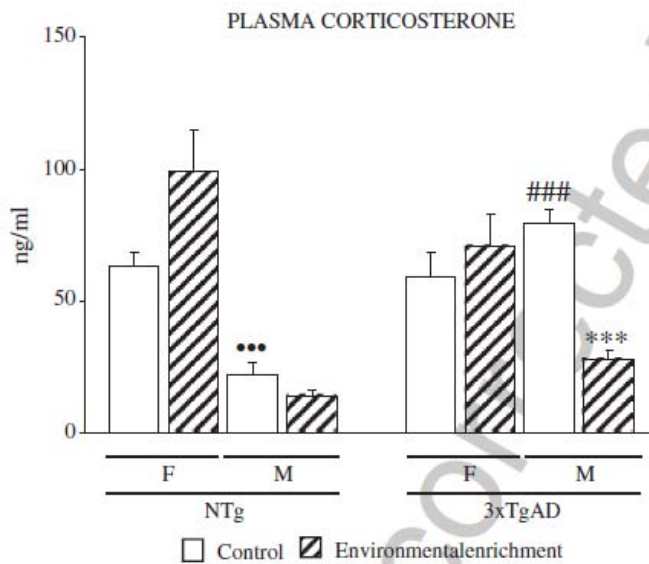


Figura 5.50.- Figura extraída de Arranz *et al.* (2011) donde se observan los niveles basales de corticosterona en plasma de los animales de 15 meses de edad de este Estudio II. El EA (“Environmental enrichment” en la Figura) disminuye los niveles de corticosterona especialmente en machos 3xTgAD, igualándolos al de los NTg controles. A la izquierda del gráfico: NTg hembras y machos; a la derecha 3xTgAD hembras y machos. *** $P < 0.001$ vs. su homólogo sin EA; ### $P < 0.001$ vs. su homólogo NTg; ... $P < 0.001$ vs. su homólogo en hembras.

Por otra parte, en el trabajo de García-Mesa *et al.* (2011) con esta misma cepa de ratones 3xTgAD a la que se le administró un tratamiento de ejercicio voluntario (uno de los componentes del tratamiento de EA) de 6 meses de duración, iniciado en la infancia-adolescencia (1 mes de edad), se observó que dicho tratamiento producía una disminución en los niveles de ansiedad de los animales a los 7 meses de edad en el test de la Caja blanca-y-negra, e incrementaba la conducta exploratoria en la Tabla de agujeros. Dichos efectos venían acompañados por una disminución en los niveles de estrés oxidativo, sin alterar los pequeños depósitos de β A y Tau que empezaban a formarse en las estructuras cerebrales de los 3xTgAD. Sin embargo, en concordancia con nuestros resultados, tampoco se observaron cambios en la conducta ansiosa de los 3xTgAD en el OF y el test de neofobia (Test de las esquinas). García-Mesa *et al.* (2011) observaban que la duración del tratamiento (comparando 1 y 6 meses de duración) y el dimorfismo sexual, eran dos factores de vital importancia en la influencia de los efectos del ejercicio.

Cuando comparamos nuestros resultados con los de otros estudios en los que también se administra EA en otros modelos de ratón para la enfermedad de Alzheimer, encontramos que son pocos los que estudian los efectos sobre la conducta ansiosa de los animales, y las conclusiones son dispares. Así, por ejemplo, Cotel *et al.* (2010) administraron el tratamiento de EA a hembras APP/PS1KI de 2 meses de edad, durante 4 meses, evaluando los beneficios del EA a los 6 meses. Los resultados obtenidos muestran como a los 6 meses, el EA no mejoró los déficits cognitivos en la memoria de trabajo, no afectó los disminuidos niveles de ansiedad que caracterizan a esta cepa transgénica, y tampoco afectó a la deposición amiloide ni produjo incremento en la neurogénesis hipocampal. De hecho el único efecto que se halló es un incremento en la degeneración axonal, sugiriendo que una intervención como el EA no es suficiente en términos de prevención en la neuropatología relativa a la enfermedad de Alzheimer.

Por otro lado Görtz *et al.* (2008) utilizando hembras TgCRND8 tratadas con EA desde la edad de 1 mes hasta los 4.5 meses, no muestran mejoras a nivel cognitivo a esta edad, mientras que el tratamiento sí que incrementa la actividad exploratoria y locomotora en el OF y el “Barrier test”, observándose también una disminución de la ansiedad en el PM por efecto del EA.

El efecto del enriquecimiento ambiental también se ve influenciado por el sexo, pues los machos 3xTgAD (pero no las hembras, ni los machos NTg) con EA muestran una clara tendencia a disminuir la actividad exploratoria en el Test de las esquinas tanto a los 12 como a los 15 meses (ver Tablas 5.4. y 5.6.). Una posible explicación podría ser que el EA disminuye la curiosidad de los animales en ambientes que a “simple vista” son poco estimulantes para ellos. Así, el Test de las esquinas no deja de ser una “caja-hogar” a la que están acostumbrados a ser introducidos una vez por semana durante el cambio de la viruta, por tanto no es particularmente estimulante para los ratones que han pasado por el tratamiento de enriquecimiento ambiental.

Sin embargo, en el test de la Caja blanca-y-negra, son especialmente las hembras (y no los machos) que recibieron EA las que muestran una reducción del “tiempo transcurrido en el compartimento iluminado” (Fig. 5.18.). En la misma línea de resultados controvertidos, Lin *et al.* (2010), por ejemplo, encuentran que en ratones C57BL/6J de 3 meses de edad, cepa utilizada como base genética en la fabricación del modelo 3xTgAD, un mes de EA disminuye la actividad exploratoria de machos y hembras en el OF, mientras que en el Laberinto en T elevado, la conducta ansiosa se ve incrementada en hembras y reducida en machos. Sin embargo, otros estudios sobre el efecto del EA en esta misma cepa han encontrado resultados contradictorios en cuanto al incremento o decremento de la actividad exploratoria (Abramov *et al.*, 2008; Kobayashi *et al.*, 2006; Pietropaolo *et al.*, 2006; Sztainberg *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 2006). La razón de estos resultados conflictivos es desconocida, pero es probable que se deba en parte a la influencia del sexo, la edad de los animales,

la duración del enriquecimiento ambiental, el tamaño de los grupos sociales, y el momento y características de la batería conductual, entre otros.

Además de la influencia de los factores recién comentados en la conducta de los animales enriquecidos, la hipótesis surgida entre los años 60 y 80 (ver revisiones de Escorihuela *et al.*, 1994b; Renner y Rosenzweig, 1987) sugiere que los animales tratados con EA no muestran superioridad respecto a los no tratados en los test que inducen poca aversión o bien poca variedad de estimulación. Es más, se aportó evidencia de que sería la organización cualitativa de la conducta exploratoria, y no los valores totales de medidas simples de la misma (ej. Latencias, tiempo de exploración, cruces, etc.), lo que se veía afectado por el tratamiento de enriquecimiento ambiental (ver revisiones de Escorihuela *et al.*, 1994b; Fernández-Teruel *et al.*, 2002; Renner y Rosenzweig, 1987). Esto explicaría la ausencia de efectos en test del tipo del Campo abierto o de la Tabla de agujeros, así como los resultados “paradójicos” en la Caja blanca-y-negra, donde las hembras EA pasan menos tiempo en el compartimento blanco, a pesar de que la “latencia” y “número de entradas” no difiere del grupo no enriquecido, indicando, por tanto, que no se trata de mayor temerosidad/ansiedad sino de menor curiosidad por un ambiente “poco estimulante”.

5.3.2. Caracterización del perfil cognitivo de aprendizaje y memoria espacial

Para evaluar el aprendizaje y la memoria espacial del modelo de ratón 3xTgAD a los 12 y 15 meses de edad en este estudio longitudinal, se realizó la prueba del Laberinto acuático de Morris (Morris *et al.*, 1984), en la que los animales deben aprender a localizar una plataforma sumergida, situada en el mismo lugar a lo largo de las cinco sesiones de adquisición, a partir de señales contextuales (aparatos, ventanas del laboratorio, etc.). Los resultados de este estudio muestran, en resumen, que existen diferencias entre genotipos, presentando los animales 3xTgAD una peor capacidad de aprendizaje y memoria espacial a ambas edades y, como novedad respecto a otros estudios realizados en el modelo 3xTgAD, también observamos que los transgénicos muestran una peor memoria de trabajo en el MWM, tanto a los 12 como a los 15 meses de edad. Además, los machos 3xTgAD también muestran una peor “transferencia” de información en el Campo abierto entre los 12 y los 15 meses, puesto que entre ambas administraciones del test manifiestan un menor grado de habituación (reflejado por la disminución de las conductas “cruces+levantamientos”) que los animales NTg.

Además de las diferencias entre genotipos, encontramos también diferencias sexuales, pues las hembras tienden a mostrar una menor eficiencia en el aprendizaje, cosa que también se ha observado en otros estudios con animales 3xTgAD a los 4-6 meses de edad (Cañete, 2011; Clinton *et al.*, 2007), y una peor memoria de trabajo en comparación con los machos.

En cuanto a los efectos del enriquecimiento ambiental, los resultados también señalan diversos efectos sobre las funciones cognitivas de los ratones. Así, el tratamiento induce leves mejoras en las capacidades cognitivas de machos y hembras, concretamente en el aprendizaje y la memoria espacial de machos

3xTgAD de 12 meses y en la memoria de trabajo a los 12 meses de edad de los ratones. Dichos efectos son, además, de diversa consideración en función del sexo (ver más adelante).

Por otra parte, encontramos también resultados paradójicos en cuanto al efecto del EA sobre las funciones cognitivas, concretamente en la tarea de aprendizaje y memoria de referencia (PT), donde las hembras de 12 meses y los machos de 15 meses enriquecidos muestran mayores distancias recorridas para hallar la plataforma que los animales no enriquecidos. Dichas cuestiones serán debatidas más adelante.

A continuación presentamos una tabla resumen (Tabla 5.9.) sobre los principales efectos de genotipo, sexo y tratamiento que encontramos en las tareas de aprendizaje y memoria del MWM, así como en el Campo abierto (habitación entre los 12 y los 15 meses) realizado a los 12 y posteriormente a los 15 meses de edad de los animales. Dichos efectos serán explicados más detalladamente en las secciones siguientes.

		Aprendizaje espacial (PT, 2 primeros días)		Memoria espacial a corto plazo (Probe test, RM 1h30)		Memoria de trabajo (DMP 15s)		Memoria a corto plazo (DMP 20min)		Aprendizaje guiado por señales (CUE)		Memoria a largo plazo / habituación (OF)		Transferencia espacial a largo plazo (PT, de 12 a 15 meses)	
		♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
12 meses	G	si	si ♂+♀	no	no	si	no	si ♂+♀		no	no	-	-	-	-
	T	si, en 3xTgAD	si, contrario en NTg	no	no	no	si	no	no	no	no	-	-	-	-
	S	si		no		si		si		no		-		-	
15 meses	G	si	no	no	si	si	si	-	-	no	si	si	no	no	no
	T	si, contrario	no	no	no	no	no	-	-	no	no	si, interacción GxT	no	si	no
	S	si		no		no		-		si		si		no	

Tabla 5.9.- Resumen de los efectos de “genotipo” (G), “tratamiento” (T), y “sexo” (S) encontrados las diversas tareas de aprendizaje y memoria del MWM y de habituación a los 15 meses de edad en el OF. En sombreado se sobresaltan los efectos encontrados. “♂+♀” Resultados obtenidos cuando se analizan ambos sexos conjuntamente; “-” Animales no testados en dicha prueba.

5.3.2.1. Efectos del genotipo a los 12 y 15 meses de edad

Déficit de aprendizaje y memoria de referencia en los ratones 3xTgAD

Como ya hemos comentado, los ratones 3xTgAD muestran una peor adquisición en la tarea de aprendizaje espacial de referencia en el MWM, tanto a los 12 como a los 15 meses de edad, reflejada a partir de mayores distancias

recorridas para encontrar la plataforma respecto a los NTg, en especial durante los 2 primeros días de la tarea (ver Tabla 5.9. y apartado de resultados 5.24. y 5.38.; Billings *et al.*, 2005; Giménez-Llort *et al.* 2007). Este hecho, ya se hacía evidente a los 6 meses de edad, donde los machos 3xTgAD empezaban a mostrar los primeros déficits cognitivos reflejados en el aprendizaje y memoria espacial en el MWM (ver Estudio I; Billings *et al.*, 2007; Cañete, 2011). Como ya se ha comentado en apartados anteriores de este trabajo (ver Tabla 2.2. de la introducción), Oddo *et al.* (2003b) describieron la presencia de placas de β A ampliamente extendidas por la corteza y el hipocampo en animales 3xTgAD de 12 meses de edad, además de detectar el inicio de la formación de ovillos neurofibrilares de Tau en el hipocampo. A los 15 meses, ya es posible detectar la extensión de dichos ovillos intraneuronales desde el hipocampo hacia la corteza (Oddo *et al.*, 2003b). De este modo, las alteraciones neuropatológicas que se producen en la corteza y el hipocampo, estructuras que participan en los procesos de aprendizaje y memoria (Eichenbaum *et al.*, 1990; Morris *et al.*, 1984; O'Keefe y Nadel, 1978), podrían ser las responsables de los déficits a nivel cognitivo que encontramos en el modelo 3xTgAD a estas edades (Billings *et al.*, 2005; Giménez-Llort *et al.*, 2007; Oddo *et al.*, 2003a-b).

El déficit de aprendizaje y memoria espacial de referencia observado en el MWM, especialmente en los dos primeros días de adquisición, que muestran los ratones 3xTgAD a los 12 y 15 meses de edad (ver Figura 5.51. más adelante), lo vemos replicado en este mismo modelo de ratón 3xTgAD en edades avanzadas en otro trabajo realizado en nuestro laboratorio con hembras de 12 meses (Giménez-Llort *et al.*, 2007), y a los 12 y 15 meses (modelo 3xTgAD) en trabajos realizados por otros grupos (Clinton *et al.*, 2007; García-Mesa *et al.*, 2011; Gulinello *et al.*, 2009). La Figura 5.24.A-B nos muestra como a los 12 meses los ratones 3xTgAD recorren mayores distancias que los NTg y, además, las hembras muestran una peor ejecución de la tarea de adquisición que los machos, tanto a los 12 como a los 15 meses (Fig. 5.24.C y 5.39.B; estas diferencias sexuales serán comentadas más adelante).

Encontramos también déficits de memoria espacial en la prueba sin plataforma en animales 3xTgAD de ambas edades, en la prueba de memoria sin plataforma, haciéndose más pronunciados a los 15 meses de edad, especialmente en hembras. A pesar de que nuestros resultados no son tan claros como los de Clinton *et al.* (2007), y no encontramos diferencias entre genotipos en las variables típicas (“a.c. totales” y “distancia en el cuadrante donde se encontraba la plataforma”), observamos los déficits de memoria en animales 3xTgAD en una de las variables importantes, como es la “distancia hasta realizar el primer cruce del anillo” (que equivaldría al siguiente ensayo de la *Place task*). Dicha variable va en la misma dirección que los resultados de Clinton *et al.* (2007), al analizar ambas edades conjuntamente, y concuerda con los resultados obtenidos por Billings *et al.* (2005) en “latencias hasta realizar el primer a.c.”. Asimismo, a los 15 meses dicho déficit de memoria se hace más evidente especialmente en hembras, señalando de nuevo el efecto del dimorfismo sexual, donde las hembras muestran peores capacidades cognitivas que los machos (Hirata-Fukae *et al.*, 2008).

En cualquier caso, veremos en la sección siguiente como los animales 3xTgAD manifiestan déficits claros en las otras tareas de aprendizaje/memoria utilizadas.

Déficits de memoria de trabajo y a corto plazo en los ratones 3xTgAD

Es conocido que la resolución de la tarea de emparejamiento retardado a una posición con 15s de diferencia (“*Delayed matching-to-place*”, DMP-15s) es dependiente de la función hipocámpica, y de los receptores NMDA dentro de esta estructura (Steele *et al.*, 1999), una de las primeras estructuras afectadas en el modelo 3xTgAD para el AD (Oddo *et al.*, 2003b). Con ella pretendemos

evaluar la flexibilidad de aprendizaje, ya que diariamente se cambia la localización de la plataforma, y la memoria de trabajo de los ratones, al pasar únicamente 15 segundos entre cada par de ensayos consecutivos (Morris, 1983; Olton *et al.*, 1979; Panakhova *et al.*, 1984). Nuestro estudio aporta, por primera vez, resultados en cuanto a la memoria de trabajo del modelo de ratón 3xTgAD, en ambos sexos y en las dos edades, ya que únicamente en otro trabajo realizado en nuestro laboratorio se evaluó la memoria de trabajo de hembras de 12 meses de edad (Giménez-Llort *et al.*, 2007). Por tanto, los presentes resultados confirman y extienden los de Giménez-Llort *et al.* (2007), puesto que en la tarea DMP-15s se observan efectos del genotipo en ambas edades (únicamente no son significativos en las hembras de 12 meses; ver Tabla 5.9.), y en la tarea de DMP-20min (memoria a corto plazo) se observan efectos del genotipo a la edad de 12 meses. Dichos efectos del genotipo, en ambas tareas, van siempre en el sentido de que los animales 3xTgAD presentan peor memoria de trabajo/corto plazo que los animales NTg.

La memoria de trabajo es una de las capacidades cognitivas que primero se ve afectada en pacientes con AD, pero no hemos encontrado trabajos de otros grupos que se hayan centrado en el estudio de dicha función en animales transgénicos como los presentes o como otros modelos para el AD. De hecho, a los 15 meses de edad, cuando la patología amiloide y neurofibrilar ya está ampliamente desarrollada (Oddo *et al.*, 2003b), los ratones 3xTgAD de ambos sexos muestran de forma evidente el déficit en la memoria de trabajo (DMP-15s; ver Fig. 5.46.B y 5.47.D), mientras que a los 12 meses de edad sólo lo presentaban los machos (ver Tabla 5.9.). Estos resultados nos sugieren un efecto de la edad, indicando que a los 15 meses, tanto machos como hembras recorren más distancia para hallar la plataforma respecto a las distancias recorridas a los 12 meses de edad, tanto en el primer como en segundo ensayo (compárense las Figuras 5.46.B y 5.47.B con las 5.29.B y 5.30.B de 12 meses). Esto permite hipotetizar que, además del déficit cognitivo en cuanto a memoria de trabajo que presentan los animales 3xTgAD, los ratones de ambos genotipos

han perdido flexibilidad cognitiva para adaptarse a nuevas estrategias de búsqueda de la plataforma, debido a la edad. Para confirmar esta hipótesis, nos fijamos en que las velocidades de natación de los ratones a los 15 meses son casi equivalentes a las que presentaban a los 12 meses (compárense Fig. 5.22. y 5.37.) y, por tanto, descartamos déficits motores como causa de las mayores distancias recorridas en edades más avanzadas. Además, en la tarea de aprendizaje de referencia (*Place task*), las distancias que recorren los animales de ambos genotipos son menores a los 15 meses que a los 12, indicando que en el caso de la *Place task* hay un efecto positivo del entrenamiento previo, mientras que en la tarea de la DMP no existe dicho efecto, sino que aparentemente se ha incrementado la dificultad de la misma para ambos genotipos a la edad de 15 meses (Morris, 1983; Olton *et al.*, 1979; Panakhova *et al.*, 1984) y la tarea es incluso más sensible al efecto “genotipo” que cuando se administró por primera vez a los 12 meses.

Por lo tanto, a partir del presente trabajo se puede proponer que la tarea de la DMP-15s (memoria de trabajo o memoria a muy corto plazo), dependiente de la función hipocámpica, podría ser un procedimiento incluso más sensible que el aprendizaje/memoria de referencia (*Place task*) para la evaluación del perfil cognitivo de modelos transgénicos para el AD. Aunque se debe tener en cuenta que ambas tareas no son excluyentes, sino complementarias, puesto que miden procesos mnésicos diferentes (Harker y Whishaw, 2002; Morris, 1983; Panakhova *et al.*, 1984; Steele, 1999; Tulving, 1983; Whishaw, 1985).

La tarea de DMP-20min, en cambio, no evalúa memoria de trabajo ya que el intervalo de tiempo que hay entre ensayos, 20 minutos, es superior al que sería definido por la memoria reciente (Olton *et al.*, 1979). A pesar de que comparten similitudes con la tarea DMP-15s, ya que los animales adquieren información que es útil solamente durante un corto período de tiempo y a partir de un único ensayo, la prueba de “emparejamiento a una posición con 20 min entre ensayos” (DMP-20min) es más bien un reflejo de la memoria

espacial de referencia a corto plazo de los animales (Steele *et al.*, 1999; Tulving 1983). Es de destacar que, en el presente trabajo, los animales 3xTgAD de 12 meses muestran claramente déficits de memoria espacial a corto plazo en la tarea de DMP-20min respecto a los NTg. Esto contrasta con un trabajo previo realizado en nuestro laboratorio en que se evaluaron hembras 3xTgAD de 12 meses en esta tarea (Giménez-Llort *et al.*, 2007), donde se observó que dichas hembras 3xTgAD no mostraban diferencias consistentes respecto a las NTg. Cabe pensar que dicha inconsistencia podría ser debida a que en el estudio de Giménez-Llort *et al.* (2007) los resultados se analizaron según las “latencias de llegada a la plataforma” en lugar de la “distancia recorrida”, puesto que como ya hemos señalado, las velocidades de natación entre ambos genotipos difieren de manera evidente, indicando que es preciso el análisis de las “distancias recorridas”.

Memoria o/y “transferencia” a largo plazo entre los 12 y 15 meses: Habitación en el Campo abierto y transferencia de información a largo plazo en el MWM

A pesar de que entre la *Place task* realizada a los 12 meses y de los 15 meses los animales han sido testados en una larga batería conductual (incluyendo diversos paradigmas en el MWM, pruebas sensorio-motoras, y el OF), existe de todos modos un recuerdo del test, que explicaremos más detalladamente a continuación (Billings *et al.*, 2007).

Las curvas de aprendizaje de referencia (*Place task*) de los ratones a las edades de 6, 12 y 15 meses (ver Fig. 5.51.), denotan que mientras que los animales de 6 y 12 meses inician la curva de aprendizaje mostrando distancias de recorrido similares (aproximadamente entre 800 y 1200cm de distancia media en la primera sesión), los animales de 15 meses, que habían sido testados previamente a los 12, muestran curvas de aprendizaje con menores distancias

recorridas que en la evaluación previa realizada a los 12 meses. Es decir, en concordancia con lo que señalan Billings *et al.* (2007) en otro estudio longitudinal realizado con ratones 3xTgAD, el entrenamiento repetido de los ratones en este test de memoria espacial, mejora la ejecución de la tarea de aprendizaje en futuras evaluaciones, señalando un efecto protector de la estimulación cognitiva repetida sobre las funciones cognitivas de los animales. En dicho estudio, el entrenamiento repetido en el MWM produjo incluso una reducción de la neuropatología amiloide y Tau, en ratones jóvenes y adultos de hasta 12 meses de edad, cuando el entrenamiento se había comenzado antes de desarrollarse la neuropatología (Billings *et al.* 2007).

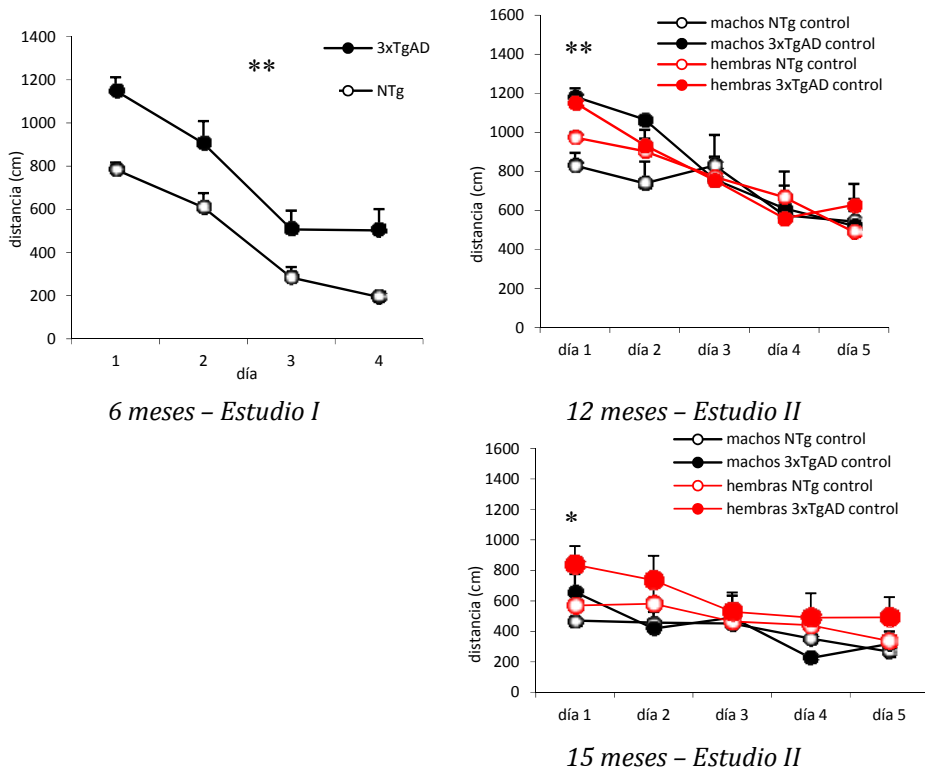


Figura 5.51.- Curvas de aprendizaje espacial en el MWM, de los ratones NTg y 3xTgAD, a los 6 meses (Estudio I) y a los 12 y 15 meses de edad (Estudio II). * $P < 0.05$, ** $P < 0.05$ efecto "genotipo".

Por otro lado, otro índice de “*transferencia*” de información a largo plazo es el grado de habituación en el test del Campo abierto entre las dos edades. A parte del efecto “genotipo” en la actividad exploratoria que observamos en el OF en ambas edades (ver en el apartado de resultados “Campo abierto”), el efecto más relevante en la “*transferencia*” de información entre ambas edades lo encontramos en el menor grado de habituación que presentan los animales 3xTgAD en el OF a los 15 meses (ver “cruces + levantamientos” en Fig. 5.36.C-D). Asimismo, también podemos observar un efecto positivo del tratamiento de EA, que mejora la “*transferencia*” de la información en machos 3xTgAD (ver Fig. 5.36.) y que comentaremos más adelante.

Recordemos que el OF es una prueba conductual de 5 minutos de duración, en la que los ratones NTg de 15 meses son presumiblemente capaces de recordar su paso previo por dicho test a los 12 meses, lo que produciría el efecto de habituación, mientras que probablemente para los 3xTgAD la experiencia previa no ha sido suficientemente larga para recordarla. En cambio, en el caso del Laberinto acuático de Morris el entrenamiento a los 12 meses duró varios días, y posiblemente sea esa la razón por la que los 3xTgAD sean capaces de recordarlo o de mostrar cierta “*transferencia*” a los 15 meses.

“Aprendizaje guiado por señales” normal en 3xTgAD de 12 meses

Por lo que respecta a la CUE (aprendizaje guiado por señales), tal y como esperábamos, nuestros resultados muestran que a los 12 meses no existen diferencias entre genotipos. Este hecho indica que los animales 3xTgAD presentan una actividad normal de natación respecto a los animales NTg cuando la plataforma está visible, y no presentan aparentes alteraciones de motivación para escapar de la piscina. Asimismo, indica que las capacidades visuales y motoras son normales. En otros trabajos realizados en nuestro

laboratorio con este mismo modelo 3xTgAD, a los 12 meses de edad los animales tampoco muestran alteraciones en esta prueba (Giménez-Llort *et al.*, 2007).

5.3.2.2. Diferencias sexuales en el AD

En los resultados del Estudio II aparecen diferencias sexuales sistemáticas en diversos paradigmas, que explicamos más detalladamente a continuación. Si agrupamos los resultados, podemos concluir que, a grandes rasgos, las hembras presentan las siguientes diferencias cognitivas respecto a los machos:

- i)** Una peor ejecución de la tarea de adquisición en el MWM tanto a los 12 como a los 15 meses de edad (Fig. 5.24.C y 5.39.B), especialmente durante los 2 primeros días de la tarea.
- ii)** Una peor memoria de trabajo a los 12 meses de edad (ver Fig. 5.29.B y 5.30.B, en la tarea DMP-15s).
- iii)** Una peor ejecución de la tarea de aprendizaje guiado por señales, en hembras 3xTgAD de 15 meses (Fig. 5.48.).
- iv)** Una mejor memoria espacial a corto plazo a los 12 meses de edad (ver Fig. 5.31.; DMP 20 min).

Por tanto, en general, las hembras muestran alteraciones cognitivas más evidentes que los machos en cuanto a aprendizaje y memoria de referencia, así como en memoria de trabajo y en el aprendizaje guiado por señales, según muestran los diversos paradigmas del MWM utilizados en este estudio. Sin embargo, es paradójico que en la tarea de DMP-20min a los 12 meses de edad, las hembras presentan, globalmente, mejor memoria de referencia a corto plazo que los machos.

Muchos procesos cognitivos tienen lugar de manera diferente en machos y en hembras. En general, los machos parecen cometer menos errores que las hembras en tareas asociadas con la memoria de referencia y memoria de trabajo en ambientes complejos. Esto parece ser debido a que los machos atienden más a los aspectos geométricos de la sala de experimentación, mientras que las hembras utilizan más aspectos del ambiente, como por ejemplo los objetos de la sala, como elementos de guía para establecer localizaciones espaciales específicas (Hines, 2002; Williams *et al.*, 1990), lo que en ciertos diseños experimentales puede favorecer la ejecución por parte de uno u otro sexo. Por eso es más común encontrar que las hembras realizan más errores en el Laberinto radial que los machos (Seymoure *et al.*, 1996) y algo parecido pasa en el MWM como veremos más abajo.

En el presente trabajo, por lo que respecta al relativo déficit cognitivo de las hembras en las tareas de aprendizaje de referencia y la memoria de trabajo, encontramos que los resultados concuerdan con los trabajos de Carroll *et al.* (2007) y Clinton *et al.* (2007), en los que se ha trabajado con este mismo modelo 3xTgAD en edades similares. Por otro lado, diversos estudios han mostrado mayores déficits cognitivos en hembras 3xTgAD a edades más tempranas, iguales o superiores a los 6 meses, en que la neuropatología ya se observa de forma clara (Billings *et al.*, 2007; Clinton *et al.*, 2007; Giménez-Llort *et al.*, 2007; Oddo *et al.*, 2003b; Pietropaolo *et al.*, 2008; Sterniczuk *et al.*, 2010). También se han podido observar estos déficits en hembras del modelo 3xTgAD en otras tareas de aprendizaje y memoria, como en la tarea de Evitación inhibitoria (*Inhibitory avoidance*, IA) (Clinton *et al.*, 2007). E, incluso en animales más jóvenes, en estadios pre-patológicos del AD Cañete (2011) mostró diferencias sexuales en el mismo sentido en animales 3xTgAD de 4 meses de edad.

Los resultados del presente trabajo y los comentados en el párrafo anterior también serían consistentes con el dimorfismo sexual hallado en diferentes

tipos de ratones transgénicos que modelan el AD. Así, en el caso de las hembras del modelo Tg2576, el APP_{swe}/PS1dE9 y el APP_{swe}/PS1, así como en las del modelo JNPL3, se observan mayores niveles de la patología (niveles de βA_{40} y de placas en los tres primeros casos, y niveles de expresión de Tau_{p301L}, en el último caso) que en machos (Callahan *et al.*, 2001; Lewis *et al.*, 2000 y 2001; Savonenko *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2003). Incluso se han encontrado diferencias sexuales en el mismo sentido en la cepa control C57BL/6J (utilizada como base para la generación del modelo 3xTgAD), en estudios sobre estrategias de orientación espacial (Bettis *et al.*, 2009). Sin embargo, existen controversias dependiendo del modelo de ratón y protocolo utilizado para la evaluación conductual, encontrándose en algunos casos mayores déficits cognitivos en machos transgénicos que en hembras. Este sería el caso, por ejemplo, del modelo APP_{swe}/PS1dE9, donde los machos de 16 meses muestran mayores déficits de memoria que las hembras en el test de Barnes (O'Leary *et al.*, 2009).

Por otra parte, uno de los resultados inesperados obtenidos en el presente estudio en cuanto a dimorfismo sexual, son las alteraciones encontradas en las hembras 3xTgAD de 15 meses en la tarea de aprendizaje guiado por señales (CUE), al presentar las mayores distancias recorridas hasta hallar la plataforma señalada por la bandera. Para explicar esta diferencia entre genotipos observada en las hembras, proponemos tres posibles hipótesis: la presencia de déficits motores, las alteraciones en las capacidades visuales, o bien, alteraciones motivacionales respecto a las hembras NTg (Fahlström *et al.*, 2011). Para descartar la hipótesis de las capacidades visuales, nos fijamos en las curvas de aprendizaje de las hembras 3xTgAD de 15 meses en la *Place task* (Fig. 5.42.), y observamos que el 3er día el grupo 3xTgAD se iguala en distancias recorridas al grupo NTg, indicando, por tanto, que las capacidades visuales para orientarse en la sala experimental son equiparables a las del grupo de hembras NTg. Asimismo, a partir del 3er día de la tarea de PT la curva de aprendizaje se vuelve asintótica, mostrando que las capacidades visuales

necesarias para la orientación son comparables a las del grupo NTg Fig. 5.42.). Por otra parte, las pruebas sensorio-motoras nos indican que las capacidades motoras de las hembras 3xTgAD no se ven empeoradas respecto a las NTg. Además, la velocidad de natación del grupo 3xTgAD es incluso superior a la de los animales NTg en ambas edades (ver Fig. 5.37.), resultados que están en concordancia con los obtenidos por Pietropaolo *et al.* (2008). Sugerimos por tanto, que el motivo de la peor ejecución de la tarea de la CUE por parte de las hembras 3xTgAD de 15 meses proviene de alteraciones en procesos motivacionales. Aunque con nuestros resultados no podemos descifrar cuáles son los motivos concretos, quizás hubiera sido relevante, para dilucidar dicha cuestión, alargar la tarea de la *Place task* unos días más, con el objetivo de observar si se daban diferencias motivacionales entre genotipos en cuanto al tiempo de escape de la piscina. Aunque este hecho no fue posible debido a que la batería conductual a los 15 meses tuvo que ser reducida por la creciente mortalidad de los animales 3xTgAD, como consecuencia de la evolución de la patología del AD.

En concordancia con estos resultados, Billings *et al.* (2007) también encontraron alteraciones de los animales 3xTgAD de 18 meses en la CUE, tanto en animales que habían pasado por un proceso de previo de entrenamiento en el MWM en diversas edades, como en animales *naive* (no testados previamente), atribuyéndolo a alteraciones visuales que impedían el aprendizaje en ambas tareas. Sin embargo, a diferencia de los resultados de Billings *et al.* (2007), nuestras hembras 3xTgAD de 15 meses sí muestran el efecto del entrenamiento en el MWM, a pesar de las alteraciones en la CUE, y por tanto descartamos las alteraciones visuales como la posible causa. Por otro lado, Gulinello *et al.* (2009), proponiendo un protocolo más sensible a la detección de cambios en el aprendizaje y la memoria en el MWM, iniciado con la evaluación de los ratones en la prueba de la plataforma visible, encontraron que existían diferencias sexuales en la CUE, donde las hembras NTg de 15-18 meses mostraban latencias de escape superiores a las de los machos,

sugiriendo que aquellas presentan tiempos de habituación más largos que los machos (Gulinello *et al.*, 2009). Aunque en nuestro estudio decidimos realizar el test de la CUE en último lugar para evitar influencias de esta prueba sobre la conducta de los animales en la *Place task*, tampoco nos fue posible discernir las razones de las diferencias que encontramos en el caso de las hembras 3xTgAD.

Otra de las posibles hipótesis que explicarían las alteraciones encontradas en la prueba del aprendizaje guiado por señales (CUE) en hembras 3xTgAD de 15 meses, así como las diferencias de genotipo encontradas en cuanto a la memoria de trabajo en la DMP-15s, sería el déficit atencional que presentan los ratones transgénicos a partir de los 9 meses de edad (Romberg *et al.*, 2011), derivado de la pérdida de receptores colinérgicos (Billings *et al.*, 2005). Diversos autores han demostrado que existe una asociación entre dicho déficit atencional y la degeneración de las neuronas colinérgicas, particularmente vulnerables en el AD (Bentley *et al.*, 2003; Davies y Maloney, 1976; Perry y Hodges, 2000; Piquard *et al.*, 2009; Whitehouse *et al.*, 1982). De este modo, se ha relacionado el déficit atencional que presentan los ratones 3xTgAD con las alteraciones patológicas de AD que se dan en la corteza prefrontal (Hirata-Fukae *et al.*, 2008), o en las neuronas colinérgicas del cerebro basal anterior. En los ratones 3xTgAD la patología Tau aparece a los 12 meses de edad en el hipocampo y posteriormente se extiende a la corteza prefrontal (Nelson *et al.*, 2007), sugiriendo que también la patología Tau puede contribuir a los déficits de atención en el modelo 3xTgAD (Romberg *et al.*, 2011). Por tanto, así como a los 12 meses el déficit atencional en los ratones 3xTgAD posiblemente viene causado por la acumulación de βA y/o la pérdida de receptores colinérgicos, a los 15 meses, los ovillos de Tau también estarían contribuyendo al incremento de los déficits atencionales (Romberg *et al.*, 2011).

Como hemos comentado, en las diversas variables evaluadas en el MWM, tales como las de aprendizaje/memoria de referencia (PT), la memoria de trabajo (DMP-15s) e incluso en el aprendizaje guiado por señales (CUE), se observan

diferencias de género en el sentido de que las hembras muestran peores capacidades cognitivas que los machos. Sin embargo, en la tarea de DMP-20min las hembras 3xTgAD de 12 meses muestran mejor memoria a corto plazo que los machos, y este es un resultado que, con la información disponible sobre estos animales y sobre otros transgénicos para el AD, no nos es posible explicar adecuadamente en este momento.

En general, no obstante, la mayoría de resultados del presente estudio indican que las hembras muestran mayores déficits cognitivos que los machos. Existen diversas teorías que apoyan estos resultados, y que a continuación resumimos.

En la historia de este modelo triple transgénico 3xTgAD, encontramos diferencias de género tanto a nivel neuropatológico (Hirata-Fukae *et al.*, 2008) como del perfil conductual. Se ha encontrado dimorfismo sexual tanto en procesos cognitivos como en la respuesta al estrés, siendo las hembras las que realizan peor las tareas cognitivas de aprendizaje/memoria que implican estrés (ej. MWM e *Inhibitory Avoidance*) y las que presentan mayor ansiedad (Clinton *et al.*, 2007; García-Mesa *et al.*, 2011; Gulinello *et al.*, 2008; Pietropaolo *et al.*, 2008 y 2009; Sterniczuk *et al.*, 2010).

No tan solo se han encontrado diferencias sexuales a nivel conductual si no que también a nivel cuantitativo del β A en hipocampo, que es más elevado en hembras, y se asocia a una patología más agresiva que en los machos 3xTgAD (Hirata-Fukae *et al.*, 2008; Nelson *et al.*, 2007; Pietropaolo *et al.*, 2008). En concordancia con esta mayor afectación por neuropatología del AD, también existe una mayor reducción de la neurogénesis en las hembras 3xTgAD (Rodríguez *et al.*, 2008). Por todo lo anterior, es razonable hipotetizar que esta mayor afectación, en términos de la neuropatología, en las hembras 3xTgAD, es probable que contribuya a los déficits cognitivos observados en el Laberinto acuático de Morris. En conjunto, observamos que, en el modelo 3xTgAD, las hembras producen tanto un aumento en la producción como una disminución

de la degradación de β A, de modo que ambos procesos contribuyen al aumento de la patología de la enfermedad. Sin embargo, no se observan diferencias de género en los niveles de Tau fosforilada (Hirata-Fukae *et al.*, 2008). No obstante, también se atribuyen las mayores alteraciones cognitivas que presentan las hembras a los efectos de las hormonas sexuales y de respuesta al estrés (Clinton *et al.*, 2007), a pesar de que los efectos y mecanismos concretos están todavía por descifrar.

Por tanto, actualmente, las discrepancias de géneros relativas al AD siguen siendo un tema sin resolver. Y aunque la mayoría de estudios epidemiológicos indican que las mujeres presentan un mayor riesgo de sufrir AD (Brookmeyer *et al.*, 1998; Hy y Keller, 2000), a pesar de tener en cuenta la mayor esperanza de vida (Fratiglioni *et al.*, 1997; Gao *et al.*, 1998; Jorm *et al.* 1987; Mölsa *et al.*, 1982; Viña *et al.*, 2010), la causa precisa todavía se desconoce (Hirata-Fukae *et al.*, 2008). Incluso existen algunos estudios que no encuentran evidencias de esta diferencia de género, indicando que ambos géneros son igualmente vulnerables al AD (Bachman *et al.*, 1993; Barnes *et al.*, 2003).

Influencia de las hormonas sexuales y de respuesta al estrés en la cognición de 3xTgAD

Como posible explicación a una mayor susceptibilidad en mujeres a desarrollar la enfermedad de Alzheimer (Fratiglioni *et al.*, 1997; Viña *et al.*, 2010), se ha sugerido que los mecanismos subyacentes en las diferencias de género pueden estar relacionados con los efectos protectores de las hormonas sexuales: la testosterona (Gouras *et al.*, 2000; Hogervorst *et al.*, 2005) en machos, y los estrógenos en hembras (Carroll *et al.*, 2007). Así, se ha visto que ratones machos 3xTgAD gonadectomizados exhiben una disminución de la función hipocampal y a su vez un incremento de la β A en hipocampo y amígdala

(Rosario *et al.*, 2006). Mientras que, en hembras ovariectomizadas, el tratamiento con estrógenos puede prevenir el incremento en la deposición de β A y el déficit de memoria (Carroll *et al.*, 2007), retrasando el inicio de la sintomatología del AD. Asimismo, también se ha observado que en hembras 3xTgAD (Iwata *et al.*, 2002), y en otros modelos murinos de AD (Caccamo *et al.*, 2005; Lazarov *et al.*, 2005), los niveles de la enzima encargada de degradar la β A (la Neprilisina), que viene regulada en parte por estrógenos (Huang *et al.*, 2004), se ven reducidos. Por este motivo se cree que la pérdida de estrógenos en la menopausia puede incrementar la susceptibilidad al AD en mujeres (Gandy y Duff, 2000). De hecho, se piensa que las gonadotropinas pueden influenciar la progresión de la patología del AD debido a que en el hipocampo existe una elevada densidad de receptores para éstas (Al-Hader *et al.*, 1997a y b; Lei *et al.*, 1993; Lukacs *et al.*, 1995), a pesar de que la posible influencia de estas hormonas en el desarrollo de la patología y/o la etiología del AD está por descifrar (Clinton *et al.*, 2007).

El estrés puede ser otro de los factores negativos que influye en el desarrollo y la progresión del AD. Los pacientes con Alzheimer muestran alteraciones en la función del eje hipotalámico-pituitario-adrenal (HPA) (Davis *et al.*, 1986; Hatzinger *et al.*, 1995; Peskind *et al.*, 1996), originándose cambios en la respuesta al estrés y produciéndose una desregulación de los niveles de cortisol (Heuser *et al.*, 1994). Así, se ha visto que pacientes con niveles de cortisol elevados realizan peor las tareas de memoria que los pacientes con AD con menores niveles de la hormona (Carlson *et al.*, 1999). Otros estudios han sugerido que los pacientes con AD no son capaces de terminar correctamente su respuesta al estrés, lo que conduce a una hiperactividad crónica del eje HPA y otros efectos nocivos sobre el cerebro envejecido (Deshmukh y Deshmukh, 1990). La combinación de los cambios en el eje HPA y de la patología del AD podrían tener un efecto sinérgico potenciándose mutuamente el uno al otro, especialmente en el hipocampo (Herman *et al.*, 1989), provocando la pérdida de memoria que se observa en pacientes con AD (Clinton *et al.*, 2007).

Los modelos múridos transgénicos de AD, entre ellos los ratones 3xTgAD, también muestran una hiperactividad en el eje HPA, que se desarrolla de manera dependiente de la edad y del sexo (Touma *et al.*, 2004). Clinton *et al.* (2007) observaron que tanto en hembras 3xTgAD de 4 (estadio pre-patológico del AD) como de 9 meses de edad (en que ya presentan la patología amiloide en la corteza e hipocampo) los niveles de corticosterona en respuesta al estrés eran mayores que los de los machos 3xTgAD, además de mostrar mayores déficits cognitivos en tareas que implicaban estrés en ambas edades, indicando que los déficits cognitivos no eran debidos únicamente a un incremento en la neuropatología en hembras respecto a los machos. Es decir, las diferencias cognitivas y de niveles de corticosterona en función del género (Barnes *et al.*, 2005; Sandberg *et al.*, 2001) se observaron en ratones 3xTgAD de 4 meses de edad, en ausencia de diferencias en placas u ovillos neurofibrilares (Clinton *et al.*, 2007). Asimismo, en hembras 3xTgAD de 15 meses (Hirata-Fukae *et al.*, 2008), así como en otros modelos múridos de AD (Callahan *et al.*, 2001; Lewis *et al.*, 2000 y 2001), la patología se desarrolla de forma más severa en hembras que en machos, sugiriendo un progresivo efecto sinérgico de la patología del AD combinada con una incrementada repuesta al estrés en ratones 3xTgAD de edad avanzada (Clinton *et al.*, 2007).

En resumen, existe una conocida relación entre estrés y procesos de aprendizaje/memoria (para revisión ver p. ej. Sandi, 2007), así como una influencia de las diferencias sexuales sobre aquellos procesos (para revisión ver Cahill, 2003), que deben tenerse en cuenta en la interpretación de resultados relacionados con la conducta del modelo 3xTgAD para la enfermedad de Alzheimer.

5.3.2.3. Efectos del tratamiento de EA sobre la cognición

Efectos del EA de mejora de los déficits de aprendizaje y memoria

De forma generalizada, podríamos decir que en el presente trabajo el enriquecimiento ambiental presenta algunos efectos positivos en determinados procesos cognitivos de los animales. Los efectos aparecen principalmente a los 12 meses de edad, así como en algunas medidas de “transferencia de información” entre las evaluaciones de los 12 y los 15 meses. Así, aún teniendo en cuenta que a menudo los efectos del EA dependen del sexo, podríamos resumir los principales resultados como sigue:

- i)** El tratamiento de EA produce una leve mejora en la adquisición de la tarea de aprendizaje y memoria espacial en el MWM que se observa particularmente en ratones macho 3xTgAD de 12 meses, durante las fases iniciales (los dos primeros días) de la adquisición de la tarea espacial (ver Fig. 5.25.A-B).

- ii)** El enriquecimiento ambiental mejora globalmente la memoria (espacial) de trabajo de los animales de 12 meses, si bien el efecto global mencionado se debe sobre todo a un importante efecto positivo sobre la ejecución de las hembras 3xTgAD (ver Fig. 5.27. y Fig. 5.52., debajo).

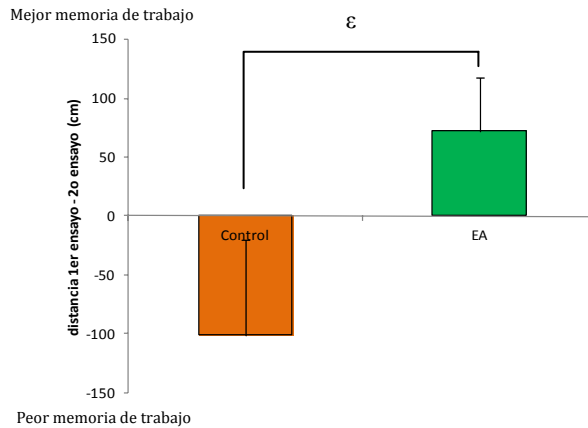


Figura 5.52.- Representación gráfica resumida del efecto positivo del EA en la memoria de trabajo (tarea DMP-15s) a los 12 meses de edad ($n=37$ para cada grupo) entre todos los ratones con EA y todos los no tratados (“control”).
 $\epsilon P<0.05$ efecto tratamiento.

- iii) Se ha observado un efecto, también aparentemente positivo, del tratamiento de EA sobre lo que hemos llamado “transferencia de información” entre el entrenamiento en la tareas del MWM a los 12 y a los 15 meses de edad, efecto que es particularmente claro en los machos (y, entre éstos, en los 3xTgAD).
- iv) Se ha observado un efecto también aparentemente positivo del tratamiento de EA sobre la “transferencia de información”, similar al fenómeno de habituación que se produce por exposición repetida, entre el test de Campo abierto a los 12 y a los 15 meses de edad, efecto que es particularmente claro en los machos (y, entre éstos, en los 3xTgAD).

La mayoría de estudios demuestran que el enriquecimiento ambiental mejora el aprendizaje y la memoria espacial (y no espacial) en ratas y ratones “estándar” (ver p. ej. Escorihuela *et al.*, 1994b, 1995a-b; Fernández-Teruel *et al.*, 1997, 2002; Lee *et al.*, 2003; Moser *et al.*, 1997; Rampon *et al.*, 2000a-b;

Schijver *et al.*, 2002) y reduce el déficit cognitivo en animales viejos (Bennett *et al.*, 2006; Escorihuela *et al.*, 1995b), probablemente como consecuencia del incremento de plasticidad neural y de la neurogénesis hipocampal, además de la generación de nuevas redes neuronales derivada de la estimulación cognitiva y multisensorial que produce el tratamiento (ver p. ej. revisiones de Fernández-Teruel *et al.*, 1997, 2002; Nithianantharajah y Hannan, 2006; Petrosini *et al.*, 2009).

En diversos modelos murinos transgénicos para la enfermedad de Alzheimer, donde la pérdida sináptica derivada de la evolución del AD es una de las características principales asociadas al declive cognitivo (Coleman *et al.*, 2003; DeKosky *et al.*, 1996), se ha observado que la sobre-estimulación (enriquecimiento) ambiental muestra un efecto beneficioso sobre la plasticidad sináptica, mejorando dicho declive cognitivo (Nithianantharajah y Hannan, 2006). En línea con lo anterior, se ha hipotetizado que el EA genera una reserva cognitiva, especialmente en determinadas estructuras cerebrales como la corteza y el hipocampo (ver p. ej. revisión de Redolat *et al.*, 2011), por lo que los ratones enriquecidos dispondrían de mayores recursos cognitivos mostrando por tanto mejoras en el aprendizaje y la memoria en la tarea del MWM.

Como dijimos arriba, el presente trabajo muestra efectos moderados y positivos del EA en las fases iniciales (dos primeros días) de la adquisición de la tarea espacial de referencia (*Place Task*), exclusivamente en machos 3xTgAD de 12 meses de edad. Asimismo, aparece un efecto global y más claro del EA (efecto positivo y significativo del factor “tratamiento”) en la memoria de trabajo medida en la tarea “DMP15s” (ver Tabla 5.9., Fig. 5.27. y 5.49.), si bien dicho efecto es más potente en hembras (y en especial las 3xTgAD; ver Fig. 5.27.).

Ambas tareas, la adquisición/aprendizaje de referencia y la memoria de trabajo, dependen de una función correcta del hipocampo (Eichenbaum *et al.*, 1990; Harker y Whishaw, 2002; Steele *et al.*, 1999; Whishaw *et al.*, 1985). Cabe decir aquí que, en la enfermedad de Alzheimer una de las primeras alteraciones cognitivas que tienen lugar se observa en la memoria de trabajo (Wolf *et al.*, 2006), debido a la acumulación intraneuronal de la β A (Oddo *et al.*, 2003b y Billings *et al.*, 2005). Por tanto, observar efectos positivos del enriquecimiento ambiental en este tipo de memoria era una de las principales hipótesis en este trabajo.

En concordancia con nuestros resultados, encontramos que en la mayoría de trabajos en los que se ha administrado un tratamiento de EA en distintos modelos de ratones transgénicos para la enfermedad de Alzheimer, independientemente de la duración del tratamiento y de la fase de desarrollo de la neuropatología en la que se encuentran los animales, el enriquecimiento ambiental ejerce efectos de mejora del deterioro cognitivo que muestran los animales.

Así encontramos que en los trabajos de Arendash *et al.* (2004) en el modelo de ratón APP_{sw}, y Costa *et al.* (2007) en el modelo PS1/PDAPP, el tratamiento de EA recupera los déficits de aprendizaje/memoria de referencia (en el test de la *Place task* para ambos modelos, y en el de la *Circular platform* también en el modelo APP_{sw}), los déficits de memoria espacial a largo plazo (*Removal 24h*), incrementa la flexibilidad de aprendizaje (en el test de la Plataforma visible) y mejora la memoria de trabajo (en el test de RAWM). Asimismo, los trabajos de Berardi *et al.* (2007) en el modelo de ratón AD11, y Wolf *et al.* (2006) con el modelo APP23, muestran como el EA también mejora el déficit de aprendizaje/memoria de referencia (*Place task*), el de memoria a largo plazo en ambos modelos transgénicos (en el test del Reconocimiento de objetos en el caso del modelo AD11; y en el *Removal 24h* en el modelo APP23), y el déficit de memoria espacial a corto plazo (en el *Removal 30 min*) en el modelo AD11. Por

otra parte, Cracchiolo *et al.* (2007), en el modelo APP_{sw}+PS1, observan una mejora del déficit de aprendizaje y memoria de referencia (en el MWM), de la memoria de trabajo (en el test de RAWN), así como la recuperación de la flexibilidad de aprendizaje (en el test de la CUE). Y, uno de los precursores de la utilización del EA en modelos transgénicos de AD, Jankowsky *et al.*, (2005), observan que el EA mejora los déficits cognitivos espaciales en la adquisición (*Place task*), la flexibilidad del aprendizaje (en el test de *Repeated-reversal MWM*) y de la memoria de trabajo (RAWN) en los modelos APP_{swe}/PS1ΔE9, APP_{swe}, y PS1dE9, además de beneficiar la memoria a largo plazo (*Removal 24h*) en los modelos APP_{swe}, y en el PS1dE9.

Sin embargo, aunque son minoritarios, también encontramos algunos trabajos en los que el EA no ejerce mejoras cognitivas sobre los déficits que presentan los ratones transgénicos. Este es el caso del trabajo de Görtz *et al.* (2008), dónde el EA no recupera los déficits cognitivos de aprendizaje y memoria espacial (test de Barnes) ni de memoria a corto plazo (test de Reconocimiento de objetos) en el modelo TgCRND8. Cotel *et al.* (2010) en el modelo APP/PS1KI, y Levi *et al.* (2003 y 2007) en el modelo de ratón de AD con la ApoE4, tampoco encuentran efectos positivos del EA sobre los déficits de memoria de trabajo (en el *Y-maze*).

La menor magnitud del efecto del EA en el presente trabajo, en comparación con otros estudios (p. ej. Arendash *et al.*, 2004; Berardi *et al.*, 2007; Costa *et al.*, 2007; Cracchiolo *et al.*, 2007; Jankowsky *et al.*, 2005; Wolf *et al.*, 2006), podría ser debida a la influencia de diversos factores, como son: el modelo de ratón estudiado, el protocolo de EA utilizado (momento de inicio y duración del tratamiento; ver revisión de Redolat *et al.*, 2011; Brenes *et al.*, 2008; Kempermann *et al.*, 2002; Leggio *et al.*, 2005), el orden de localización del test dentro de la batería conductual (Billings *et al.*, 2007) y la sensibilidad de la prueba conductual (Görtz *et al.*, 2008), el tipo de patología y la edad en que los animales fueron testados, además de las diferencias de género (Peña *et al.*,

2006; Redolat *et al.*, 2011). Sin embargo, como en la literatura sobre el tema no se utiliza nada similar a un protocolo de EA estandarizado, es difícil discriminar entre las variables que pueden influir en los efectos de dicho tratamiento. Aún así, y a pesar de que los estudios publicados no permiten concluir con exactitud cuáles son los factores concretos que influyen en las respuestas cognitivas de los animales enriquecidos, diversos trabajos señalan que el estado de desarrollo de la patología en la edad de inicio del EA, así como la duración del tratamiento, son dos de los factores que más influyen en los efectos de éste.

Así, por ejemplo, se ha sugerido que el inicio del tratamiento de enriquecimiento ambiental o de tratamientos de entrenamiento cognitivo en edades en las que todavía no hay depósitos de β A, pueden ejercer mayores efectos beneficiosos sobre las funciones cognitivas (Billings *et al.*, 2007; Cotel *et al.*, 2010). La sugerencia concreta sería que el tratamiento de EA en ratones transgénicos para el AD, así como tratamientos similares (de enriquecimiento/entrenamiento cognitivo) en humanos, podrían ser más efectivos para la prevención de los síntomas o/y evolución del AD si se aplicasen en fases pre-neuropatológicas (Billings *et al.*, 2007; Cotel *et al.*, 2010). Un soporte importante a tal propuesta es el trabajo de Billings *et al.* (2007), en el que demuestran una importante prevención de los déficits cognitivos y un retraso significativo de la aparición de la neuropatología, observables hasta las edades de 12-15 meses, en ratones 3xTgAD que recibieron sobre-entrenamiento en el MWM a los 2, 6 y 9 meses de edad. Sin embargo, en relación con lo expuesto arriba, Billings *et al.* (2007) demuestran que es crucial que el inicio del entrenamiento se produzca antes de la aparición de neuropatología evidente, puesto que los efectos positivos del sobre-entrenamiento se observaban mucho más claros en ratones 3xTgAD entrenados a partir de los 2 meses de edad, que en aquellos que se empezaron a entrenar a partir de los 6 meses de edad (Billings *et al.*, 2007).

Recordemos aquí, que los ratones 3xTgAD no presentan signos neuropatológicos a los 2 meses de edad, mientras que a los 6 meses presentan inmunoreactividad a la β A intraneuronal en el hipocampo y la corteza, y empiezan a aparecer los primeros depósitos amiloides de forma difusa en dichas estructuras (ver Tabla 2.2. en la “Introducción”; Billings *et al.*, 2005; Oddo *et al.* 2003b). De este modo, el inicio del EA a los 6 meses, una vez iniciada la deposición amiloide, resultaría en una menor efectividad del tratamiento sobre la recuperación de los déficits cognitivos que presentarán los animales en edades más avanzadas. En concordancia con nuestros resultados encontramos el trabajo de Cotel *et al.* (2010), el cual sugiere que la falta de efectos del EA sobre las funciones cognitivas (concretamente en la memoria de trabajo) del modelo APP/PS1KI, es debido a que el tratamiento se inició a los 2 meses de edad de los animales, edad en la que ya presentan los primeros depósitos amiloides.

El ejercicio físico voluntario es uno de los factores intrínsecos al tratamiento de enriquecimiento ambiental. De modo que, en la literatura, diversos trabajos han tratado la influencia de aquel factor de manera independiente a la del EA, e incluso han hecho hincapié en las diferencias que generan uno y otro tratamiento sobre los déficits cognitivos que presentan modelos transgénicos para el AD. No es un objetivo de este trabajo valorar las diferencias entre los efectos del EA y del ejercicio, pero sí debemos tener en cuenta que la exposición de los ratones transgénicos al ejercicio voluntario es un tipo de “enriquecimiento ambiental” que da lugar a mejoras cognitivas y/o cambios en la neuropatología típica de la enfermedad de Alzheimer. A continuación revisaremos algunos de los trabajos más recientes en los que la administración del ejercicio tiene relevancia en las funciones cognitivas de algunos modelos de ratón transgénicos para el AD.

Continuando con lo que comentábamos anteriormente, la edad de inicio del tratamiento de estimulación cognitiva (sea EA y/o ejercicio físico voluntario)

es un factor determinante en la recuperación de los déficits cognitivos que muestran los ratones transgénicos para el AD. Así, además de los trabajos de Billings *et al.* (2007) en el modelo 3xTgAD, y de Cotel *et al.* (2010), sugiriendo que la falta de efectos del EA sobre las funciones cognitivas en el modelo APP/PS1KI es debida a que el tratamiento se inició a una edad en la que ya presentan los primeros depósitos amiloides, encontramos otro trabajo en el que se administra “ejercicio” que va en la misma dirección. Este es el caso del modelo de ratón TgCRND8, donde la administración de ejercicio voluntario (elemento intrínseco al tratamiento de EA) tampoco produce mejoras cognitivas (de aprendizaje y memoria, a corto y largo plazo), ni reducción en la deposición amiloide, debido a que el inicio del ejercicio se realizó a los 3 meses de edad, cuando la neuropatología ya estaba presente (Richter *et al.*, 2008).

La intensidad y duración del tratamiento de EA (o de ejercicio físico) utilizado, también es un factor determinante la detección de mejoras cognitivas en los ratones transgénicos. Así, García-Mesa *et al.* (2011) encuentra mayores efectos de mejora de los déficits de retención de la memoria en ratones 3xTgAD de 7 meses de edad, a los que se les administró 6 meses de ejercicio voluntario que a los que se les administró 1 mes de ejercicio. Wolf *et al.* (2006), sin embargo, encuentran que así como el EA produce mejoras en el aprendizaje y memoria de ratones APP23 acompañados de un incremento en la expresión de genes que expresan factores como la NT-3 y el BDNF, además de un incremento en la neurogénesis hipocampal, la administración solamente de ejercicio no produce los mismos efectos de mejora cognitiva, además de disminuir la expresión de genes que expresan factores de crecimiento neuronal. Se ha visto, incluso, que el ejercicio correlaciona positivamente con la deposición amiloide en ratones TgCRND8 (Richter *et al.*, 2008). Asimismo, Costa *et al.* (2007) encuentra efectos de mejora de los déficits cognitivos, acompañados de una reducción en la deposición de la β A en ratones PS1/PDAPP, únicamente cuando el EA va combinado con ejercicio (tal y como hemos administrado el EA en este estudio); mientras que con el EA sólo, observa una mejora de las funciones

cognitivas, acompañado de un “paradójico” incremento en la deposición de β A. Por otro lado, este hecho sugiere que el EA puede producir mejoras de las funciones cognitivas de los animales mediante mecanismos tanto dependientes (de limpieza de los depósitos de β A) como independientes (generación de reserva cognitiva y neurogénesis en determinadas estructuras cerebrales) de la deposición de la β A.

Arendash *et al.* (2004), en concordancia con nuestros resultados, encuentra que el EA mejora la memoria de trabajo en ratones APP_{sw} de edades avanzadas, evaluando a los animales en el *Radial arm water maze* (RAWM). Estas mejoras cognitivas, sin embargo, no van acompañadas de cambios en la carga total (placas difusas y compactas) de β A. Costa *et al.* (2007) también encontraron mejoras en la memoria de trabajo de ratones PS1/PDAPP en el RAWM, cuando el EA va acompañado de ejercicio (como sucede en nuestro estudio). Y Berardi *et al.* (2007) también observaron que los ratones AD11 enriquecidos recuperaron los déficits de la memoria de trabajo.

Efectos del EA sobre la “transferencia” de información entre el entrenamiento a los 12 meses y las tareas de los 15 meses

Otro de los efectos del EA, que observamos en este estudio, es la mejora de la *transferencia* de información entre la tarea de *Place task* llevada a cabo a los 12 meses y la que se repitió a los 15 meses de edad, mostrando como los ratones macho enriquecidos muestran mejor “transferencia”, a pesar de haber pasado previamente en la misma piscina por otras tareas de evaluación de las capacidades cognitivas y de memoria como la Prueba del RM de 1h30, la DMP-15s y DMP-20min, y por último la CUE. Esto sugiere que los animales enriquecidos muestran una mayor flexibilidad de aprendizaje de nuevas tareas que los animales no enriquecidos. Nuestros resultados no han podido ser

comparados con otros estudios longitudinales de enriquecimiento, si bien el trabajo de Billings *et al.* (2007) demostró que el “sobre-entrenamiento” (en tareas del MWM) a diferentes edades (entre los 2 y 6 meses) producía *transferencia* de información que se reflejaba en la ejecución en tareas espaciales similares en los ratones 3xTgAD de edades más avanzadas. Aún así, aunque nuestro estudio y el de Billings *et al.* (2007) indiquen efectos sobre la *transferencia* de información, consecuencia de un entrenamiento previo o del EA, es obvio que se necesita otro tipo de diseño experimental para alcanzar conclusiones inequívocas. En este sentido, diversos autores que administran EA en ratones transgénicos, señalan la importancia de dividir los animales en grupos para ser evaluados en distintas edades (estudios transversales dentro de un longitudinal), en lugar de hacer únicamente estudios longitudinales en los que no se puede evaluar concretamente el impacto de la *transferencia* de información entre edades (Berardi *et al.*, 2007; Cotel *et al.*, 2010).

En concordancia con los resultados de *transferencia* de información que se produce entre la *Place task* de los 12 y los 15 meses, encontramos que el EA también produce un efecto positivo sobre la *transferencia* de información en el test de Campo abierto, similar al fenómeno de habituación que se produce por exposición repetida, que se da entre los 12 y los 15 meses de edad. Este efecto es particularmente claro en los machos (y, entre éstos, en los 3xTgAD), tal y como sucede en la *transferencia* que se produce en la *Place task*, también en machos.

Los efectos positivos del enriquecimiento que observamos sobre la *transferencia* de información de los 12 a los 15 meses en el MWM y en la prueba del Campo abierto, no tenemos la certeza de que sean debidos exclusivamente al tratamiento de EA o al efecto del entrenamiento. Como demuestran Billings *et al.* (2007) con el entrenamiento de los animales 3xTgAD en el MWM en varias edades, los efectos del entrenamiento son más visibles en edades avanzadas cuando los animales empezaron a entrenarse a los 2 meses,

en lugar de a los 6 meses. De modo que en nuestros resultados, el efecto del entrenamiento en el mismo test (MWM) a los 12 meses podría producir un efecto sinérgico con el EA, observándose como resultado el efecto de mejora de la “*transferencia*” de información a los 15 meses en los animales enriquecidos. Dilucidar si el efecto encontrado se debe al EA o a la sinergia del EA con el entrenamiento, sólo podríamos hacerlo evaluando los animales en un estudio transversal (donde los animales no han pasado previamente por los test de los 12 meses) dentro del estudio longitudinal.

¿El EA mejora las capacidades cognitivas en modelos de ratón de AD mediante la disminución de la carga amiloide?

La cuestión de si el tratamiento de enriquecimiento ambiental produce mejoras a nivel cognitivo como consecuencia, al menos en parte, de una reducción en los niveles de βA , es todavía hoy tema de debate.

La mayor parte de los estudios de EA en modelos de ratón transgénicos para el AD han demostrado que el EA, si bien produce mejoras de los déficits cognitivos que presentan los animales, este hecho puede ser debido tanto a mecanismos dependientes como independientes a la deposición de βA (Costa *et al.*, 2007).

En general, la literatura indica que la mayoría de estudios muestran que la recuperación del declive cognitivo que presentan los ratones va acompañada de una reducción de la deposición amiloide. Este sería el caso de los trabajos de Cracchiolo *et al.* (2007) con el modelo APP_{sw}+PS1, de Costa *et al.* (2010), en que la deposición amiloide disminuye en un 50% tras la administración de EA en el modelo PS1/PDAPP, y de Berardi *et al.* (2007), en que el EA también disminuye la formación de depósitos amiloides en el modelo AD11, a pesar de que no se

reduce la formación de ovillos de Tau hiperfosforilada en la corteza. Otros trabajos, centrados únicamente en el estudio de la evolución de la neuropatología, también indican que el tratamiento de enriquecimiento ambiental disminuye la formación de placas amiloides. Dicha disminución se produce bien porque hay una menor deposición, porque disminuye la ratio $\beta A_{42}/\beta A_{40}$, o bien por un incremento de la expresión de proteínas que se encargan de la limpieza del péptido amiloide (mediante la Nephilysin, Transthyretin, etc.). Así, Mirochnic *et al.* (2003), a pesar de no encontrar una disminución en los depósitos de βA , observan una disminución de la ratio $\beta A_{42}/\beta A_{40}$ en el modelo APP23. Herring *et al.* (2011) y Hu *et al.* (2010) también observan que el EA disminuye la formación de placas amiloides en los modelos TgCRND8 y APP_{swe}/PS1 Δ E9 respectivamente, además de atenuar la patología Tau en el modelo APP_{swe}/PS1 Δ E9. Y, Lahiani-Cohen *et al.* (2011) encuentran que el EA disminuye los niveles de Tau en modelo transgénico para dicha proteína, el E257K/P301S-Tau-Tg.

Existen también otros trabajos que no encuentran efectos de disminución de la neuropatología tras el tratamiento de EA e incluso la exacerban. Este es el caso de los trabajos de Arendash *et al.* (2004) y Wolf *et al.* (2006), en los que se muestra que a pesar de la clara mejora cognitiva tras el tratamiento de EA, los depósitos amiloides en el hipocampo y la corteza no varían en el modelo APP_{swe} y APP23. E incluso, el efecto paradójico obtenido en el trabajo de Jankowsky *et al.* (2003 y 2005), en que el EA produce un incremento en los niveles de βA_{42} y βA_{40} , que, como consecuencia, lleva al incremento de la formación de placas amiloides.

En los animales del presente trabajo, sacrificados a los 16 meses tras las últimas pruebas conductuales, se halla en curso el estudio histológico del efecto del EA sobre la neuropatología en las áreas diana (hipocampo, amígdala y corteza) que se ven afectadas en el modelo de ratón 3xTgAD. Las fotografías que se muestran en la Figura 5.53. son únicamente los primeros ejemplos

correspondientes a hipocampos de animales NTg y 3xTgAD, controles y enriquecidos. En ellas es aparente la presencia de depósitos de β A (compárese la fotografía “*b*” con “*a*”) y ovillos neurofibrilares (compárese la fotografía “*d*” con “*c*”) en el animal 3xTgAD sin tratamiento, mientras que la fotografía “*e*” parece mostrar una menor presencia de Tau hiperfosforilada en el animal 3xTgAD con enriquecimiento ambiental. Estos análisis histológicos se encuentran en curso, pero unidos a los moderados efectos positivos del EA hallados en nuestro estudio, así como en las medidas hormonales del estudio de Arranz *et al.* (2011), nos permiten mantener un cierto optimismo respecto a la posibilidad de hallar algún efecto beneficioso del EA sobre la evolución de la neuropatología en el modelo 3xTgAD.

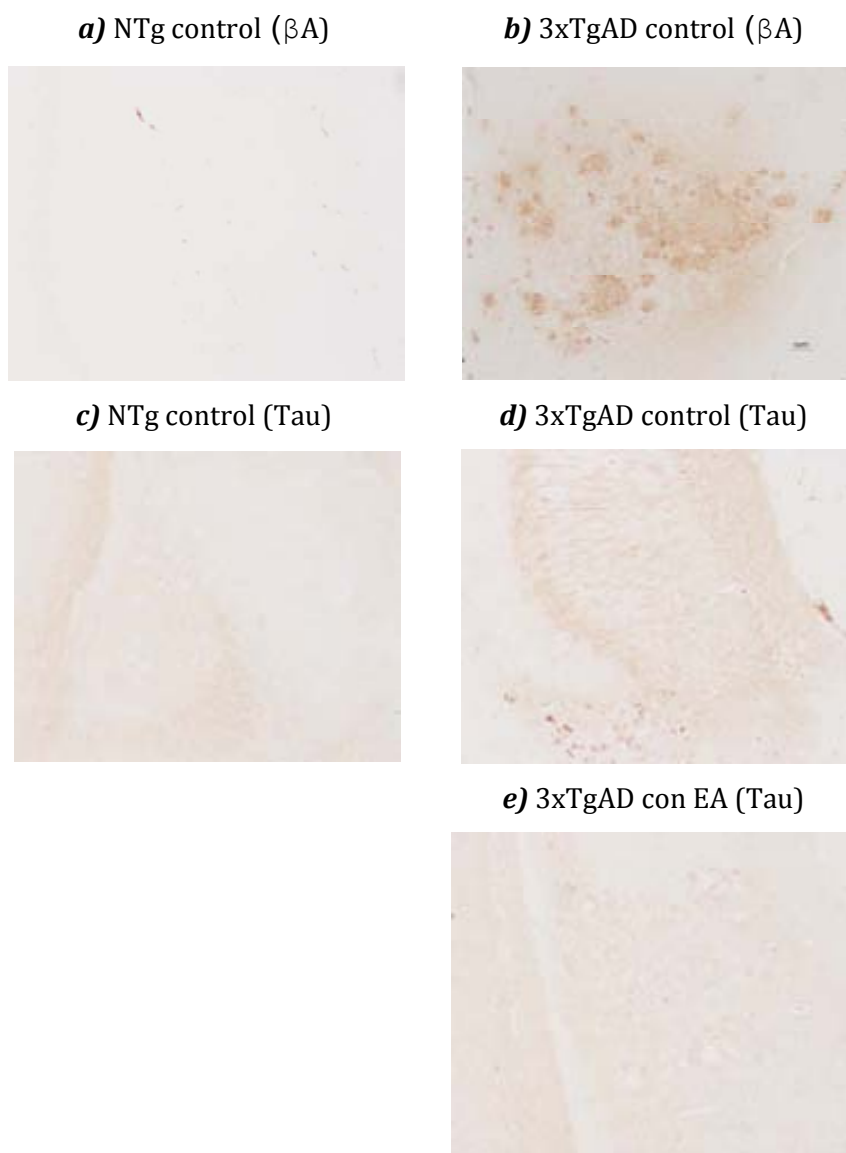


Figura 5.53.- Fotos cedidas por el Dr. Juan Beauquis y Lidia Manzo. Tinciones del hipocampo (región CA1) de animales de 15 meses de edad del Estudio II. Las fotos **b** y **d** muestran como el ratón 3xTgAD de 15 meses presenta más depósitos del péptido β -amiloide y ovillos neurofibrilares de Tau que el animal NTg (**a** y **c**). El animal 3xTgAD enriquecido (**e**) muestra menos ovillos que el transgénico control (**d**), equiparándose a los niveles del ratón NTg (**c**). NTg (en la parte izquierda), 3xTgAD (en la parte derecha). **a)** NTg control y **b)** 3xTgAD control (tinción de la β A), **c)** NTg control y **d)** 3xTgAD control (tinciones de la Tau), **e)** 3xTgAD con EA (tinción de la Tau).

5.3.3. Curva de supervivencia

El estudio del modelo de ratón 3xTgAD ha ayudado a comprender que el proceso de degeneración neuroendocrina que se da durante el envejecimiento normal, ocurre de manera similar en la enfermedad de Alzheimer, aunque de manera acelerada. Esto ha sugerido que en el AD, y concretamente en el modelo 3xTgAD, se produce una senescencia prematura de los individuos que padecen la enfermedad, especialmente visible en machos 3xTgAD a los 15 meses de edad (Giménez-Llort *et al.*, 2008).

Diversos estudios sobre los efectos del enriquecimiento ambiental y otros procedimientos que promueven la actividad social y cognitiva, han demostrado ser eficientes en la reversión de los efectos adversos del envejecimiento de los sistemas neuroimmunoendocrinos, incrementando la longevidad de los animales gracias a tratamientos de larga duración (Escorihuela *et al.*, 1995a; Mattson *et al.*, 2001; Segovia *et al.*, 2006, 2009; Zambrana *et al.*, 2007). Tal y como comentamos en otros apartados del presente trabajo, se ha visto incluso que los efectos del enriquecimiento ambiental producen mejoras en la cognición y en las respuestas conductuales en una gran variedad de modelos murinos de AD, y en algunos, como los ratones 3xTgAD, incluso reducen la patología (p. ej. Arendash *et al.*, 2004; Görtz *et al.*, 2008; Lazarov *et al.*, 2005).

Arranz *et al.* (2011), continuando con la caracterización fisiológica de estos mismos ratones 3xTgAD de 15 meses de edad, utilizados en el Estudio II, observaron que los efectos del tratamiento de EA en la función inmunitaria son complejos, y se observa un claro dimorfismo sexual en ellos. En general, los machos 3xTgAD son el grupo que mayor senescencia inmunitaria muestran, pero también el grupo en que se observan mejor los efectos beneficiosos del tratamiento de enriquecimiento sobre el sistema inmunitario (Arranz *et al.*, 2011). De este modo, se observó que los animales 3xTgAD envejecidos, en los

que el declive relativo a la edad es más remarcable, también son los más beneficiados de la exposición al enriquecimiento ambiental en cuanto al sistema inmune se refiere (Arranz *et al.*, 2010). Por ejemplo, las células del timo de los machos 3xTgAD de 15 meses, que muestran baja citotoxicidad frente a células tumorales (Arranz *et al.*, 2010), se muestran beneficiadas tras el tratamiento de EA, pues mejoran su actividad de *Natural Killers* (NK), y se igualan a la actividad de las células de animales NTg control. La actividad *Natural Killer* de estas células, que constituyen un sistema de defensa del organismo ya que son la protección antitumoral principal del mismo, se considera uno de los biomarcadores más sensibles de la homeostasis del sistema neuroinmunoendocrino (Fiserová *et al.*, 2002; Mocchegiani *et al.*, 2004), y el EA recupera parcialmente el deterioro que se produce durante el desarrollo del AD en los ratones 3xTgAD (Arranz *et al.*, 2011). En resumen, estos y otros parámetros, que señalan el declive del sistema inmunitario durante el envejecimiento normal, y aún más acentuado en la enfermedad de Alzheimer y en los ratones 3xTgAD, se ven parcialmente recuperados con el tratamiento de EA (Arranz *et al.*, 2011).

Arranz *et al.* (2011) encontraron también que la mejora que el EA produce en la función inmunitaria en los machos 3xTgAD envejecidos, coincide con una reducción en los niveles de corticosterona plasmática (ver Fig. 5.54.), llegando a los niveles que presentan los machos NTg adultos.

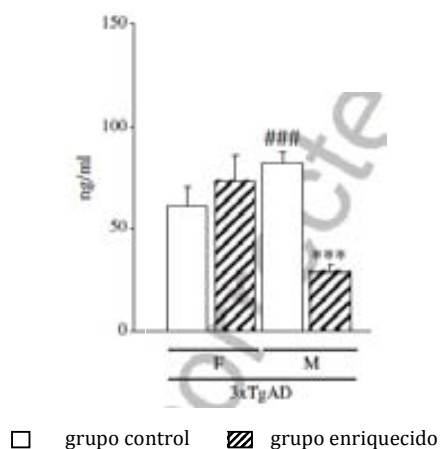


Figura 5.54.- Niveles de corticosterona basal en plasma en ratones 3xTgAD de 15 meses de edad del Estudio II. El EA disminuye los niveles de corticosterona plasmática especialmente en machos 3xTgAD. Figura extraída de Arranz *et al.* (2011).

Otros estudios realizados en animales envejecidos han demostrado que el estrés crónico contribuye a mimetizar, incrementar y posiblemente a acelerar los efectos del envejecimiento de la función inmune (Coutellier *et al.*, 2009). El estrés puede ser un factor negativo que influye en el desarrollo y la progresión del AD, y se sabe que los pacientes con AD también muestran cambios en la función del eje hipotalámico-pituitario-adrenal (HPA) (Davis *et al.*, 1986; Hatzinger *et al.*, 1995; Peskind *et al.*, 1996), sugiriendo alteraciones en la respuesta al estrés de dichos pacientes. En cuanto a los modelos murinos utilizados para el estudio de este factor, se ha visto que los animales envejecidos (Zambrana *et al.*, 2007), y de igual modo el modelo 3xTgAD (Giménez-Llort *et al.*, 2007, 2008), también presentan respuestas emocionales al estrés incrementadas. El EA reduce la hiperactividad del eje HPA que se da en estos animales 3xTgAD envejecidos (ver Fi. 5.54.; Arranz *et al.*, 2011; Belz *et al.*, 2003).

De acuerdo con ello, se ha propuesto que la mejora que el EA produce sobre la función inmunitaria deteriorada de animales 3xTgAD envejecidos, descrita por Arranz *et al.* (2011), podría estar mediada por una respuesta del eje HPA al estrés más controlada. En resumen, la mayor vulnerabilidad del sistema neuroendocrino y neuroinmunitario de los animales 3xTgAD, y en especial de los machos transgénicos, podrían contribuir al incremento de la mortalidad observada en estos animales (Giménez-Llort *et al.*, 2008). Este incremento en la mortalidad de los animales podría ser, al menos en parte, revertido por el mantenimiento de una vida activa desde la edad adulta hasta edades avanzadas. De modo que el EA podría disminuir en cierto modo el curso agresivo de la enfermedad y mejorar la calidad de vida de los individuos (Arranz *et al.*, 2011).

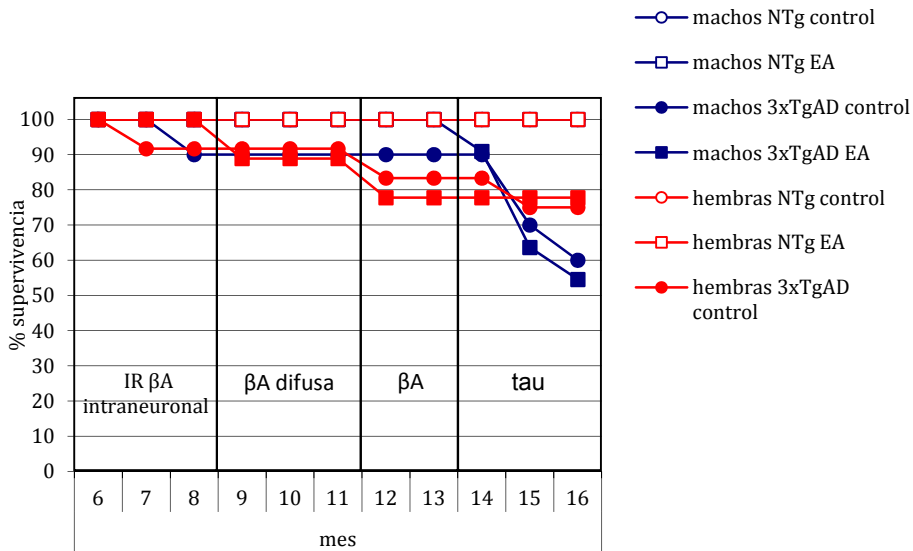


Figura 5.49.- Curva de supervivencia de los ratones 3xTgAD hasta los 16 meses de edad, en el momento del sacrificio. Los animales 3xTgAD muestran una reducción de la supervivencia antes de cumplir los 16 meses de vida.

En el presente estudio no estamos en disposición de comprobar estas suposiciones, dado que el estudio finalizó a los 15 meses de edad de los animales. Sin embargo sí que se ha comprobado, como vemos en la Figura 5.49. (repetida aquí para facilitar la comprensión), que se daba más prematura mortalidad en los ratones 3xTgAD.

Será interesante, en futuros estudios, evaluar si el EA u otros tratamientos de estimulación sensorial/cognitiva/física (en edades infantiles, adolescentes o adultas) son capaces de incrementar la longevidad en base a efectos positivos sobre sistemas neuroinmunoendocrinos mencionados anteriormente (Arranz *et al.*, 2011).

5.4. CONCLUSIONES ESTUDIO II

- I) Respecto a sus controles NTg, los ratones 3xTgAD no muestran déficits sensorio-motores a ninguna edad, mientras que sí presentan un incremento significativo del peso corporal.
- II) Respecto a sus controles NTg, los ratones 3xTgAD muestran un perfil de ansiedad o temerosidad incrementada a los 12 y 15 meses de edad, como sugieren la reducción general de actividad exploratoria y el incremento en las latencias de movimiento en los diferentes test de novedad, así como el incremento de defecaciones en varios de ellos. Estos efectos se observan especialmente claros en machos.
- III) En los test de novedad/temerosidad, el tratamiento de enriquecimiento ambiental ejerce algunos efectos “paradójicos” y no consistentes, tanto en animales NTg como 3xTgAD de ambas edades. Así, mientras que parece incrementar algunos índices de temerosidad (Test de las esquinas y DLB) también reduce otros, como es el caso de las defecaciones en la DLB. La inconsistencia y escasa magnitud (aunque significativa) de tales efectos tal vez sea atribuible a alteraciones poco predecibles en la motivación por ambientes poco estimulantes, como son los mencionados test.
- IV) Respecto a sus controles NTg, los ratones 3xTgAD muestran déficits de aprendizaje/memoria de referencia espacial, especialmente visibles durante el inicio (2 primeros días) de la adquisición. Tal efecto es más evidente en machos.
- V) El entrenamiento repetido de los ratones en la tarea de adquisición de memoria espacial (*Place task* a los 12 meses), mejora la ejecución de la tarea de aprendizaje en futuras evaluaciones a edades avanzadas (15

meses), sugiriendo un efecto protector del entrenamiento previo sobre la función cognitiva de los animales.

- VI)** Respecto a sus controles NTg, los ratones 3xTgAD muestran déficits de memoria de trabajo (DMP-15s) en ambas edades y de memoria a corto plazo (DMP-20min) a los 12 meses de edad.

- VII)** Como resultado paradójico encontramos que respecto a sus controles NTg, las hembras 3xTgAD de 15 meses de edad muestran alteraciones, probablemente de motivación, en la tarea de “Localización de la plataforma visible (CUE)” en el MWM.

- VIII)** Respecto a sus controles NTg, los ratones 3xTgAD, y más claramente los machos, muestran déficits en la *transferencia* de información (habitación) que se produce entre las pruebas de Campo abierto realizadas a los 12 y posteriormente a los 15 meses.

- IX)** El tratamiento de enriquecimiento ambiental mejora levemente los déficits de adquisición de la tarea de aprendizaje/memoria de referencia en machos 3xTgAD de 12 meses; y recupera parcialmente los déficits de memoria de trabajo que muestran los ratones 3xTgAD, especialmente en las hembras.

- X)** El tratamiento de enriquecimiento ambiental mejora la *transferencia* de información, entre los 12 y los 15 meses (especialmente visible en machos 3xTgAD), en la tarea de *Place task* y del Campo abierto.

- XI)** Existe un claro dimorfismo sexual en los ratones 3xTgAD a los 12 meses. De modo que, en general, los machos muestran mayores niveles de ansiedad, y las hembras, mayores déficits cognitivos.

XII) Respecto a sus controles, se observa un incremento significativo de la mortalidad en animales 3xTgAD en las etapas avanzadas de la neuropatología/enfermedad.

XIII) Por lo tanto, podemos concluir que, los ratones 3xTgAD a los 12 y 15 meses de edad, muestran un perfil de ciertas funciones cognitivas (espaciales), de algunas respuestas emocionales (neofobia, temerosidad) y de disminución de la longevidad, que modelan ciertos síntomas de los estadios avanzados de la enfermedad de Alzheimer. En este sentido, puede decirse que este modelo de ratón transgénico presenta cierta validez, que lo hace interesante para estudios ulteriores de mayor alcance y profundidad.

XIV) El tratamiento de enriquecimiento ambiental, administrado a los ratones 3xTgAD en etapas en que la neuropatología del AD ya está presente (a los 6 meses de edad), induce efectos positivos moderados sobre los déficits cognitivos. Esto sugiere que serán necesarios ulteriores estudios para determinar el momento de inicio y duración del tratamiento, a efectos de optimizar su repercusión sobre la neuropatología y sintomatología en el presente modelo de ratón transgénico.

Aportaciones y limitaciones

6. RECAPITULACIÓN: APORTACIONES Y LIMITACIONES DEL PRESENTE TRABAJO

A pesar de la dificultad de encontrar un buen modelo animal que simule o replique la enfermedad de Alzheimer, podemos considerar que los resultados presentes contribuyen a ampliar la validez de los ratones 3xTgAD como un modelo animal con un buen potencial para estudiar los mecanismos neuronales y neuroendocrinos subyacentes a algunos procesos psicológicos/conductuales alterados y relevantes en el AD, así como para evaluar posibles estrategias terapéuticas o preventivas. Los déficits cognitivos en aprendizaje/memoria de referencia y de trabajo en el modelo 3xTgAD, en especial a los 6, 12 y 15 meses de edad, permiten atribuir a este modelo una cierta validez para el estudio de la evolución del deterioro cognitivo en relación a la progresión de la neuropatología (ver también Cañete, 2011) y a similares manifestaciones/progresión en el AD humano.

Así, el presente trabajo muestra que los ratones 3xTgAD manifiestan, en general, inhibición conductual en diferentes situaciones/tests que implican la “novedad” (esto es, son situaciones neofóbicas) como característica común. Dicho efecto se observa en las diferentes edades (2.5, 6, 12 y 15 meses) evaluadas. Que tal inhibición conductual ante situaciones que implican diferentes grados de novedad sea debida a un incremento de la temerosidad/neofobia en los ratones transgénicos, y no únicamente a una disminución de su actividad motora basal, lo sugiere el hecho de que las capacidades motoras no parecen alteradas o deficitarias en los animales 3xTgAD en otras tareas que exigen niveles de actividad (y capacidad muscular) normal, tales como las tareas del MWM (la velocidad de natación, en particular) y la batería sensorio-motora, entre otras (ver también Cañete, 2011).

Asimismo, particularmente entre los 6-12-15 meses de edad, los ratones 3xTgAD presentan déficits cognitivos espaciales que se corresponden con lo que sería esperable partiendo de la premisa de que la evolución de la neuropatología (β -amiloide y de la Tau) conlleva un empeoramiento también progresivo de dichas funciones cognitivas. Los déficits cognitivos en los ratones transgénicos, relativos a la memoria espacial de trabajo y a corto plazo a los 12 meses de edad, parecen especialmente relevantes por cuanto no se habían demostrado hasta ahora y porque son déficits que también se producen en las fases iniciales del AD, cuando el trastorno aún se califica como de probable AD (o AD moderado). Los efectos significativos y positivos del tratamiento de enriquecimiento ambiental, aunque moderados en intensidad, se han observado en esencia sobre dichos procesos de memoria de trabajo y a corto plazo, aunque su magnitud depende del sexo de los animales. Aún así, tales efectos aparecen como más potentes en los animales transgénicos, aquellos que presentan peor función cognitiva en dichas tareas.

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

Por otra parte, en cuanto a los resultados obtenidos en aprendizaje/memoria espacial, en especial a los 2.5 y 6 meses de edad, también refuerzan la hipótesis de que la β A intraneuronal pueda ser un marcador primario en el inicio del

deterioro cognitivo, lo que a su vez podría ser relevante en la enfermedad de Alzheimer. Aunque parece claro que para que aparezcan dichos procesos ligados a la β A intraneuronal debe ser necesario que existan otros procesos neurales ya previamente alterados.

A pesar de la implicación de los factores genéticos en la enfermedad (en el AD), es muy importante considerar los efectos de los factores ambientales, ya que los genes no se expresan de forma aislada respecto al medio ambiente, sino en interacción con el mismo a lo largo de toda la ontogenia o ciclo vital (desde la etapa prenatal, pasando por la infancia/adolescencia hasta las etapas adultas y el envejecimiento). Existen muchas evidencias que muestran el impacto del ambiente en la inducción de cambios cerebrales, incluyendo neurogénesis en el hipocampo en la edad adulta y en el envejecimiento, en paralelo a cambios en la función cognitiva (ver p. ej. Codita *et al.*, 2006). Por otra parte, como hemos revisado en el presente trabajo, experiencias ambientales en sentido amplio, como el estrés de diversos tipos o el exceso de glucocorticoides, agravan o aceleran la neuropatología AD en modelos de ratón.

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

Nuestro trabajo ha puesto de manifiesto que el EA puede reducir moderadamente la magnitud de algunos déficits cognitivos en ratones 3xTgAD adultos, de mediana edad (12 meses), que ya presentan evidencias de neuropatología similar al AD (según nuestros indicios preliminares -ver “Discusión del Estudio II-, y según trabajos de p. ej. Billings *et al.*, 2005, Oddo *et al.*, 2003a; ver sección “2.3.2.” en la “Introducción”). Presumiblemente, estos déficits o alteraciones deben tener unos mecanismos neuronales/neuroendocrinos subyacentes, que se ponen en marcha en alguna etapa temprana a lo largo del desarrollo (probablemente bastante previa a la edad de los ratones de este estudio), y tales mecanismos son los que en un futuro deberían estudiarse, en cuanto a su relación con la aparición de la sintomatología AD en estos animales y en cuanto a las posibilidades de modulación a través de experiencias (o tratamientos) ambientales como el EA.

Debemos destacar, no obstante, ciertas limitaciones del presente estudio. Por una parte sería necesario realizar estudios con EA que se iniciase a edades más tempranas, claramente pre-neuropatológicas, como por ejemplo entre los 1-2 meses de edad. Los animales deberían ser evaluados en test/tareas indicadoras de BPSDs y cognitivas, de manera transversal y a diferentes edades, incluidas etapas tempranas pre-neuropatológicas, como los 2, 3 y 4 meses de edad. Deberían compararse los resultados de tales estudios transversales (simultáneamente, si fuese posible) con los de estudios longitudinales en los que los ratones pasasen por múltiples pruebas “BPSD” y “entrenamientos cognitivos” a diferentes edades. Sería muy recomendable, además, que se evaluaran las características y rendimientos cognitivos (aprendizaje y memoria) no solo en tareas espaciales usando el MWM, como en el presente trabajo, sino en otras espaciales y no espaciales, incondicionadas y condicionadas, como pueden ser el “test de Barnes”, laberintos radiales, reconocimiento/discriminación de objetos, Laberinto en “T” o en “Y”, evitación pasiva/condicionamiento clásico aversivo, aprendizaje instrumental apetitivo y aversivo, etc.

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

Conclusiones generales

7. CONCLUSIONES GENERALES

- I) Respecto a sus controles, los animales 3xTgAD no muestran déficits sensorio-motores a ninguna edad, sino que incluso muestran capacidades sensorio-motoras superiores. Asimismo, presentan un incremento del peso corporal.

- II) En etapas tempranas del desarrollo de la enfermedad (2.5 y 6 meses de edad de los ratones 3xTgAD), cuando únicamente se detecta la acumulación intraneuronal de βA en la corteza y el hipocampo, los ratones 3xTgAD muestran leves déficits en las funciones cognitivas, de aprendizaje y memoria espacial a corto plazo en el Laberinto acuático de Morris. Dichos déficits cognitivos van acompañados de un incremento en los niveles de ansiedad/temerosidad (disminución de la actividad exploratoria en animales de 2.5 y 6 meses en el Campo abierto, e incremento de las defecaciones en el Campo abierto, la Tabla de agujeros de Boissier y la Caja blanca-y-negra) de los ratones 3xTgAD, que parecen incrementarse con la edad y el avance de la neuropatología.

- III) En las etapas más avanzadas del desarrollo de la neuropatología (12 y 15 meses de edad de los ratones 3xTgAD), cuando las placas de βA y los ovillos neurofibrilares están ampliamente extendidos por la corteza y el hipocampo, los animales 3xTgAD muestran déficits cognitivos de aprendizaje y memoria espacial, memoria de trabajo y a corto plazo en el MWM, así como de *transferencia* de información a largo plazo en el MWM y el OF. Dichos déficits van acompañados de niveles incrementados de respuestas de inhibición conductual o temerosidad en los ratones 3xTgAD.

- IV)** El tratamiento de enriquecimiento ambiental, iniciado en fases tempranas de desarrollo de la neuropatología (a los 6 meses, cuando la β A intraneuronal está extendida y se inicia su deposición extracelular), ejerce efectos positivos moderados en algunas tareas cognitivas. Así, mejora el inicio del aprendizaje espacial y la memoria de trabajo en el MWM, así como la *transferencia* de información a largo plazo en el MWM y el OF entre los 12 y los 15 meses de edad.
- V)** Existen diferencias sexuales en cuanto a la manifestación de las alteraciones cognitivas y de ansiedad/temerosidad que muestran los ratones 3xTgAD en las etapas avanzadas de la enfermedad. Así, los machos muestran mayores niveles de inhibición conductual o temerosidad, mientras que las hembras presentan mayores déficits cognitivos. El enriquecimiento ambiental muestra distintos efectos en función del sexo.
- VI)** Resumiendo, por los resultados del presente trabajo y los estudios revisados, podemos concluir que los ratones 3xTgAD constituyen un buen modelo para el estudio de la enfermedad de Alzheimer, pues presentan alteraciones cognitivas y emocionales (y de longevidad) que se inician con la acumulación intraneuronal del péptido β A y se agravan con la evolución de neuropatología.
- VII)** No obstante, el perfil de los ratones 3xTgAD observado en las pruebas sensorio-motoras no sería consistente con (o no se puede considerar que modele adecuadamente) aspectos relevantes de dichas funciones en los pacientes con enfermedad de Alzheimer.
- VIII)** El enriquecimiento ambiental administrado a los ratones 3xTgAD en etapas en las que ya se ha iniciado el desarrollo de la neuropatología, produce ciertos efectos positivos, aunque muy moderados, sobre los

déficits cognitivos. Los efectos del enriquecimiento ambiental sobre las alteraciones emocionales que presentan los ratones 3xTgAD son escasos e inconsistentes entre los diferentes test conductuales. Esto sugiere que el enriquecimiento ambiental, si bien es un tratamiento que influye de manera positiva reduciendo algunas alteraciones cognitivas en el modelo, no es suficientemente potente como para mitigar completamente las alteraciones producidas por el avance de la neuropatología en los estadios más avanzados. El momento o edad de inicio del tratamiento (previo o posterior al inicio de la neuropatología), así como la intensidad y duración del mismo, probablemente sean factores cruciales que determinarán la potencia y sentido de los efectos del enriquecimiento ambiental.

Referencias

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abramov U, Puusaar T, Raud S, Kurrikoff K, Vasar E. 2008. Behavioural differences between C57BL/6 and 129S6/SvEv strains are reinforced by environmental enrichment. *Neurosci Lett.* 443, 223-7.

Acevedo A, Loewenstein DA. 2007. Nonpharmacological cognitive interventions in aging and dementia. *J Geriatr Psychiatry Neurol.* 20, 239-49.

Adlard PA, Perreau VM, Pop V, Cotman CW. 2005. Voluntary exercise decreases amyloid load in a transgenic model of Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 25, 4217-21.

Albeck DS, Sano K, Prewitt GE, Dalton L. 2006. Mild forced treadmill exercise enhances spatial learning in the aged rat. *Behav Brain Res.* 168, 345-8.

AL-Hader AA, Lei ZM, Rao CV. 1997a. Neurons from fetal rat brains contain functional luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptors. *Biol Reprod.* 56, 1071-6.

AL-Hader AA, Lei ZM, Rao CV. 1997b. Novel expression of functional luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptors in cultured glial cells from neonatal rat brains. *Biol Reprod.* 56, 501-7.

Arai JA, Feig LA. 2011. Long-lasting and transgenerational effects of an environmental enrichment on memory formation. *Brain Res Bull.* 85, 30-5.

Arendash GW, Garcia MF, Costa DA, Cracchiolo JR, Wefes IM, Potter H. 2004. Environmental enrichment improves cognition in aged Alzheimer's transgenic mice despite stable beta-amyloid deposition. *Neuroreport.* 15, 1751-4.

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

Arranz L, De Castro NM, Baeza I, Maté I, Viveros MP, De la Fuente M. 2010. Environmental enrichment improves age-related immune system impairment: long-term exposure since adulthood increases life span in mice. *Rejuvenation Res.* 13, 415-28.

Arranz L, De Castro NM, Baeza I, Giménez-Llort L, De la Fuente M. 2011. Effect of Environmental Enrichment on the Immunoendocrine Aging of Male and Female Triple-Transgenic 3xTg-AD Mice for Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis.* [ahead of print]

Artero S, Tierney MC, Touchon J, Ritchie K. 2003. Prediction of transition from cognitive impairment to senile dementia: a prospective, longitudinal study. *Acta Psychiatr Scand.* 107, 390-3.

Artola A, von Frijtag JC, Fermont PC, Gispen WH, Schrama LH, Kamal A, Spruijt BM. 2006. Long-lasting modulation of the induction of LTD and LTP in rat hippocampal CA1 by behavioural stress and environmental enrichment. *Eur J Neurosci.* 23, 261-72.

Auld DS, Kornecook TJ, Bastianetto S, Quirion R. 2002. Alzheimer's disease and the basal forebrain cholinergic system: relations to beta-amyloid peptides, cognition, and treatment strategies. *Prog. Neurobiol.* 68, 209-45.

Austin MP, Leader LR, Reilly N. 2005. Prenatal stress, the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, and fetal and infant neurobehaviour. *Early Hum Dev.* 81, 917-26.

Bachman DL, Wolf PA, Linn RT, Knoefel JE, Cobb JL, Belanger AJ, White LR, D'Agostino RB. 1993 Incidence of dementia and probable Alzheimer's disease in a general population: the Framingham Study. *Neurology*. 43, 515-9.

Ball K, Berch DB, Helmers KF, Jobe JB, Leveck MD, Marsiske M, Morris JN, Rebok GW, Smith DM, Tennstedt SL, Unverzagt FW, Willis SL. 2002. Effects of cognitive training interventions with older adults: a randomized controlled trial. *JAMA*. 288, 2271-81.

Barbelivien A, Herbeaux K, Oberling P, Kelche C, Galani R, Majchrzak M. 2006. Environmental enrichment increases responding to contextual cues but decreases overall conditioned fear in the rat. *Behav Brain Res*. 169, 231-8.

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

Barnes LL, Wilson RS, Schneider JA, Bienias JL, Evans DA, Bennett DA. 2003. Gender, cognitive decline, and risk of AD in older persons. *Neurology*. 60, 1777-81.

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

Bayer TA, Wirths O. 2011. Intraneuronal A β as a trigger for neuron loss: can this be translated into human pathology? *Biochem Soc Trans*. 39, 857-61.

Beatty WW, Winn P, Adams RL, Allen EW, Wilson DA, Prince JR, Olson KA, Dean K, Littleford D. 1994. Preserved cognitive skills in dementia of the Alzheimer's type. *Arch. Neurol*. 51, 1040-46.

Beaulieu C, Colonnier M. 1989. Number and size of neurons and synapses in the motor cortex of cats raised in different environmental complexities. *J Comp Neurol.* 289, 178-81.

Belz EE, Kennell JS, Czambel RK, Rubin RT, Rhodes ME. 2003. Environmental enrichment lowers stress-responsive hormones in singly housed male and female rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 76, 481-6.

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

Benaroya-Milshtein N, Hollander N, Apter A, Kukulansky T, Raz N, Wilf A, Yaniv I, Pick CG. 2004. Environmental enrichment in mice decreases anxiety, attenuates stress responses and enhances natural killer cell activity. *Eur J Neurosci.* 20, 1341-7.

Bennett EL, Rosenzweig MR, Diamond MC. 1969. Rat brain: effects of environmental enrichment on wet and dry weights. *Science.* 163, 825-6.

Bennett JC, McRae PA, Levy LJ, Frick KM. 2006. Long-term continuous, but not daily, environmental enrichment reduces spatial memory decline in aged male mice. *Neurobiol Learn Mem.* 85, 139-52.

Bentley P, Vuilleumier P, Thiel CM, Driver J, Dolan RJ. 2003. Cholinergic enhancement modulates neural correlates of selective attention and emotional processing. *Neuroimage.* 20, 58-70.

Berardi N, Braschi C, Capsoni S, Cattaneo A, Maffei L. 2007. Environmental enrichment delays the onset of memory deficits and reduces neuropathological hallmarks in a mouse model of Alzheimer-like neurodegeneration. *J Alzheimers Dis.* 11, 359-70.

Berman RF, Hannigan JH, Sperry MA, Zajac CS. 1996. Prenatal alcohol exposure and the effects of environmental enrichment on hippocampal dendritic spine density. *Alcohol.* 13, 209-16.

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

Bick-Sander A, Steiner B, Wolf SA, Babu H, Kempermann G. 2006. Running in pregnancy transiently increases postnatal hippocampal neurogenesis in the offspring. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103, 3852-7.

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

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

Bizon J, Prescott S, Nicolle MM. 2007. Intact spatial learning in adult Tg2576 mice. *Neurobiol Aging.* 28, 440-6.

Black JE, Isaacs KR, Anderson BJ, Alcantara AA, Greenough WT. 1990. Learning causes synaptogenesis, whereas motor activity causes angiogenesis, in cerebellar cortex of adult rats. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87, 5568-72.

Bliss TV, Collingridge GL. 1993. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*, 361, 31-9.

Borchelt DR, Thinakaran G, Eckman CB, Lee MK, Davenport F, Ratovitsky T, Prada CM, Kim G, Seekins S, Yager D, Slunt HH, Wang R, Seeger M, Levey AI, Gandy SE, Copeland NG, Jenkins NA, Price DL, Younkin SG, Sisodia SS. 1996. Familial Alzheimer's disease-linked presenilin 1 variants elevate Abeta1-42/1-40 ratio in vitro and in vivo. *Neuron* 17, 1005-13.

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

Bowling SL, Rowlett JK, Bardo MT. 1993. The effect of environmental enrichment on amphetamine-stimulated locomotor activity, dopamine synthesis and dopamine release. *Neuropharmacology.* 32, 885-93.

Boyd-Kimball D, Castegna A, Sultana R, Poon HF, Petroze R, Lynn BC, Klein JB, Butterfield DA. 2005. Proteomic identification of proteins oxidized by Abeta(1-42) in synaptosomes: implications for Alzheimer's disease. *Brain Res.* 1044, 206-15.

Braak H, Braak E, Bohl J, Bratzke H. 1998. Evolution of Alzheimer's disease related cortical lesions. *J Neural Transm Suppl.* 54, 97-106.

Brenes JC, Rodríguez O, Fornaguera J. 2008. Differential effect of environment enrichment and social isolation on depressive-like behavior, spontaneous activity and serotonin and norepinephrine concentration in prefrontal cortex and ventral striatum. *Pharmacol Biochem Behav.* Mar;89(1):85-93. Epub 2007 Nov 22.

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

Brookmeyer R, Gray S, Kawas C. 1998. Projections of Alzheimer's disease in the United States and the public health impact of delaying disease onset. *Am J Public Health.* 88, 1337-42.

Bruel-Jungerman E, Laroche S, Rampon C. 2005. New neurons in the dentate gyrus are involved in the expression of enhanced long-term memory following environmental enrichment. *Eur J Neurosci.* 21, 513-21.

Butterfield DA, Castegna A, Drake J, Scapagnini G, Calabrese V. 2002. Vitamin E and neurodegenerative disorders associated with oxidative stress. *Nutr Neurosci* 5, 229-39.

Butterfield DA, Drake J, Pocernich C, Castegna A. 2001. Evidence of oxidative damage in Alzheimer's disease brain: central role for amyloid beta-peptide. *Trends Mol Med.* 7, 548-54.

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

Caccamo A, Oddo S, Sugarman MC, Akbari Y, LaFerla FM. 2005. Age- and region-dependent alterations in Abeta-degrading enzymes: implications for Abeta-induced disorders. *Neurobiol Aging.* 26, 645-54.

Cahill L. 2003. Sex-related influences on the neurobiology of emotionally influenced memory. *Ann N Y Acad Sci.* 985:163-73.

Calder PC. 2001. Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and immunity. *Lipids*. 36, 1007-24.

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

Carlson LE, Sherwin BB, Chertkow HM. 1999. Relationships between dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) and cortisol (CRT) plasma levels and everyday memory in Alzheimer's disease patients compared to healthy controls. *Horm Behav*. 35, 254-63.

Carlson MC, Helms MJ, Steffens DC, Burke JR, Potter GG, Plassman BL. 2008. Midlife activity predicts risk of dementia in older male twin pairs. *Alzheimers Dement*. 4, 324-31.

Carroll JC, Rosario ER, Chang L, Stanczyk FZ, Oddo S, LaFerla FM, Pike CJ. 2007. Progesterone and estrogen regulate Alzheimer-like neuropathology in female 3xTg-AD mice. *J Neurosci*. 27, 13357-65.

Casas C, Sergeant N, Itier JM, Blanchard V, Wirths O, van der Kolk N, Vingtdoux V, van de Steeg E, Ret G, Canton T, Drobecq H, Clark A, Bonici B, Delacourte A, Benavides J, Schmitz C, Tremp G, Bayer TA, Benoit P, Pradier L. 2004. Massive CA1/2 neuronal loss with intraneuronal and N-terminal truncated Abeta42 accumulation in a novel Alzheimer transgenic model. *Am J Pathol*. 165:1289-00.

Cañete T. 2011. Efectos de la estimulación postnatal en el perfil cognitivo y emocional del modelo de ratón 3xTgAD para la enfermedad de Alzheimer. (Tesis), UAB.

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

Chapillon P, Patin V, Roy V, Vincent A, Caston J. 2002. Effects of pre- and postnatal stimulation on developmental, emotional, and cognitive aspects in rodents: a review. *Dev Psychobiol.* 41, 373-87.

Chapillon P, Manneché C, Belzung C, Caston J. 1999. Rearing environmental enrichment in two inbred strains of mice: 1. Effects on emotional reactivity. *Behav Genet.* 29, 41-6.

Chapman PF, White GL, Jones MW, Cooper-Blacketer D, Marshall VJ, Irizarry M, Younkin L, Good MA, Bliss TV, Hyman BT, Younkin SG, Hsiao KK. 1999. Impaired synaptic plasticity and learning in aged amyloid precursor protein transgenic mice. *Nat Neurosci* 2, 271-6.

Chen KS, Masliah E, Grajeda H, Guido T, Huang J, Khan K, Motter R, Soriano F, Gmaes D. 1998. Neurodegenerative Alzheimer-like pathology in PDAPP 717V \rightarrow F transgenic mice. *Prog. Brain Res.* 117, 327-34.

Chen G, Chen KS, Knox J, Inglis J, Bernard A, Martin SJ, Justice A, McConlogue L, Games D, Freedman SB, Morris RG. 2000. A learning deficit related to age and beta-amyloid plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nature.* 408, 975-79.

Chishti MA, Yang DS, Janus C, Phinney AL, Horne P, Pearson J, Strome R, Zuker N, Loukides J, French J, Turner S, Lozza G, Grilli M, Kunicki S, Morissette C, Paquette J, Gervais F, Bergeron C, Fraser PE, Carlson GA, George-Hyslop PS, Westaway D. 2001. Early-onset amyloid deposition and cognitive deficits in transgenic mice expressing a double mutant form of amyloid precursor protein 695. *J Biol Chem.* 276, 21562-70.

Choi SH, Veeraraghavalu K, Lazarov O, Marler S, Ransohoff RM, Ramirez JM, Sisodia SS. 2008. Non-cell-autonomous effects of presenilin 1 variants on enrichment-mediated hippocampal progenitor cell proliferation and differentiation. *Neuron*. 59, 568-80.

Cirrito JR, Yamada KA, Finn MB, Sloviter RS, Bales KR, May PC, Schoepp DD, Paul SM, Mennerick S, Holtzman DM. 2005. Synaptic activity regulates interstitial fluid amyloid-beta levels in vivo. *Neuron*. 48, 913-22.

Cirrito JR, Kang JE, Lee J, Stewart FR, Verges DK, Silverio LM, Bu G, Mennerick S, Holtzman DM. 2008. Endocytosis is required for synaptic activity-dependent release of amyloid-beta in vivo. *Neuron*. 58, 42-51.

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

Codita A, Winblad B, Mohammed AH. 2006. Of mice and men: more neurobiology in dementia. *Curr Opin Psychiatry*. 19, 555-63.

Coleman PD, Yao PJ. 2003. Synaptic slaughter in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 24, 1023-7.

Comery TA, Shah R, Greenough WT. 1995. Differential rearing alters spine density on medium-sized spiny neurons in the rat corpus striatum: evidence for association of morphological plasticity with early response gene expression. *Neurobiol Learn Mem*. 63, 217-9.

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

Cotman CW, Berchtold NC. 2002. Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. *Trends Neurosci.* 25, 295-301.

Cotel MC, Jawhar S, Christensen DZ, Bayer TA, Wirths O. 2010. Environmental enrichment fails to rescue working memory deficits, neuron loss, and neurogenesis in APP/PS1KI mice. *Neurobiol Aging.* 33, 96-107.

Coutellier L, Würbel H. 2009. Early environmental cues affect object recognition memory in adult female but not male C57BL/6 mice. *Behav Brain Res.* 203, 312-5.

Cracchiolo JR, Mori T, Nazian SJ, Tan J, Potter H, Arendash GW. 2007. Enhanced cognitive activity--over and above social or physical activity--is required to protect Alzheimer's mice against cognitive impairment, reduce Abeta deposition, and increase synaptic immunoreactivity. *Neurobiol Learn Mem.* 88, 277-94.

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

Crawley JN. 1985. Exploratory behavior models of anxiety in mice. *Neurosci Biobehav Rev.* 9, 37-44.

Crews L, Rockenstein E, Masliah E. 2010. APP transgenic modeling of Alzheimer's disease: mechanisms of neurodegeneration and aberrant neurogenesis. *Brain Struct Funct.* 214, 111-26.

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

Davis KL, Davis BM, Greenwald BS, Mohs RC, Mathé AA, Johns CA, Horvath TB. 1986. Cortisol and Alzheimer's disease, I: Basal studies. *Am J Psychiatry.* 143, 300-5.

Davies P, Maloney AJ. 1976. Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet.* 2, 1403.

De Deyn PP, Goeman J, Vervaet A, Dourcy-Belle-Rose B, Van Dam D, Geerts E. 2011. Prevalence and incidence of dementia among 75-80-year-old community-dwelling elderly in different districts of Antwerp, Belgium: The Antwerp Cognition (ANCOG) Study. *Clin Neurol Neurosurg.* [ahead of print]

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

DeKosky ST, Scheff SW. 1990. Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer's disease: correlation with cognitive severity. *Ann. Neurol.* 27, 457-64.

DeKosky ST, Scheff SW, Styren SD. 1996. Structural correlates of cognition in dementia: quantification and assessment of synapse change. *Neurodegeneration.* 5, 417-21.

Del Arco A, Segovia G, Garrido P, de Blas M, Mora F. 2007. Stress, prefrontal cortex and environmental enrichment: studies on dopamine and acetylcholine release and working memory performance in rats. *Behav Brain Res.* 176, 267-73.

Denenberg VH, Woodcock JM, Rosenberg KM. 1968. Long-term effects of preweaning and postweaning free-environment experience on rats' problem-solving behavior. *J Comp Physiol Psychol.* 66, 533-5.

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

Deshmukh VD, Deshmukh SV. 1990. Stress-adaptation failure hypothesis of Alzheimer's disease. *Med Hypotheses.* 32, 293-5.

Diamond MC, Ingham CA, Johnson RE, Bennett EL, Rosenzweig MR. 1976. Effects of environment on morphology of rat cerebral cortex and hippocampus. *J Neurobiol.* 7, 75-85.

Diamond MC, Krech D, Rosenzweig MR. 1964. The effects of an enriched environment on the histology of the rat cerebral cortex. *J Comp Neurol.* 123, 111-20.

Diamond MC, 1988. Enriching heredity. The impact of the environment on the anatomy of the brain, Vol. New York: The Free Press.

Dickson DW, Crystal HA, Bevona C, Honer W, Vincent I, Davies P. 1995. Correlations of synaptic and pathological markers with cognition of the elderly. *Neurobiol. Aging* 16, 285-04.

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

Diniz DG, Foro CA, Rego CM, Gloria DA, de Oliveira FR, Paes JM, de Sousa AA, Tokuhashi TP, Trindade LS, Turiel MC, Vasconcelos EG, Torres JB, Cunningham C, Perry VH, Vasconcelos PF, Diniz CW. 2010. Environmental impoverishment and aging alter object recognition, spatial learning, and dentate gyrus astrocytes. *Eur J Neurosci.* 32, 509-19.

Dodart JC, Mathis C, Saura J, Bales KR, Paul SM, Ungerer A. 2000. Neuroanatomical abnormalities in behaviorally characterized APP(V717F) transgenic mice. *Neurobiol Dis,* 7, 71-85.

Dodart JC, Mathis C, Bales KR, Paul SM. 2002. Does my mouse have Alzheimer's disease? *Genes Brain Behav.,* 1, 142-55.

Duff K, Eckman C, Zehr C, Yu X, Prada CM, Perez-tur J, Hutton M, Buee L, Harigaya Y, Yager D, Morgan D, Gordon MN, Holcomb L, Refolo L, Zenk B, Hardy J, Younkin S. 1996 Increased amyloid-beta₄₂(43) in brains of mice expressing mutant presenilin 1. *Nature.* 383, 710-3.

Duffy SN, Craddock KJ, Abel T, Nguyen PV. 2001. Environmental enrichment modifies the PKA-dependence of hippocampal LTP and improves hippocampus-dependent memory. *Learn Mem.* 8, 26-34.

During MJ, Cao L. 2006. VEGF, a mediator of the effect of experience on hippocampal neurogenesis. *Curr Alzheimer Res.* 3, 29-33.

Ehninger D, Kempermann G. 2003. Regional effects of wheel running and environmental enrichment on cell genesis and microglia proliferation in the adult murine neocortex. *Cereb Cortex.* 13, 845-51.

Eichenbaum H, Stewart C, Morris RG. 1990. Hippocampal representation in place learning. *J Neurosci.* 10, 3531-42.

Eikelenboom P, Veerhuis R, Scheper W, Rozemuller AJ, van Gool WA, Hoozemans JJ, 2006. The significance of neuroinflammation in understanding Alzheimer's disease. *J Neural Transm.* 113, 1685-95.

Engelhart MJ, Geerlings MI, Ruitenbergh A, van Swieten JC, Hofman A, Witteman JC, Breteler MM. 2002a. Dietary intake of antioxidants and risk of Alzheimer disease. *JAMA.* 287, 3223-9.

Engelhart MJ, Geerlings MI, Ruitenbergh A, Van Swieten JC, Hofman A, Witteman JC, Breteler MM. 2002b. Diet and risk of dementia: Does fat matter? The Rotterdam Study. *Neurology.* 59, 1915-21.

Ernfors P, Hallböök F, Ebendal T, Shooter EM, Radeke MJ, Misko TP, Persson H. 1988. Developmental and regional expression of beta-nerve growth factor receptor mRNA in the chick and rat. *Neuron.* 1, 983-96.

Escorihuela RM, Fernández-Teruel A, Vallina IF, Baamonde C, Lumbreras MA, Dierssen M, Tobeña A, Flórez J. 1995b. A behavioral assessment of Ts65Dn mice: a putative Down syndrome model. *Neurosci Lett.* 199, 143-6.

Escorihuela RM, Vallina IF, Martínez-Cué C, Baamonde C, Dierssen M, Tobeña A, Flórez J, Fernández-Teruel A. 1998. Impaired short- and long-term memory in Ts65Dn mice, a model for Down syndrome. *Neurosci Lett.* 247, 171-4.

Escorihuela RM, Fernández-Teruel A, Tobeña A, Vivas NM, Marmol F, Badia A, Dierssen M. 1995c. Early environmental stimulation produces long-lasting changes on beta-adrenoceptor transduction system. *Neurobiol Learn Mem.* 64, 49-57.

Escorihuela RM, Tobeña A, Fernández-Teruel A. 1994a. Environmental enrichment reverses the detrimental action of early inconsistent stimulation and increases the beneficial effects of postnatal handling on shuttlebox learning in adult rats. *Behav Brain Res.* 61, 169-73.

Escorihuela RM, Tobeña A, Fernández-Teruel A. 1994b. L'estimulació infantil. Efectes de l'ambient primerenc i l'herència sobre l'emotivitat i l'aprenentatge. Servei de Publicacions de la Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona.

Escorihuela RM, Tobeña A, Fernández-Teruel A. 1995a. Environmental enrichment and postnatal handling prevent spatial learning deficits in aged hypoemotional (Roman high-avoidance) and hyperemotional (Roman low-avoidance) rats. *Learn Mem.* 2, 40-8.

España J, Giménez-Llort L, Valero J, Miñano A, Rábano A, Rodríguez-Alvarez J, LaFerla FM, Saura CA. 2010. Intraneuronal beta-amyloid accumulation in the amygdala enhances fear and anxiety in Alzheimer's disease transgenic mice. *Biol Psychiatry.* 67, 513-21

Fahlström A, Yu Q, Ulfhake B. 2011. Behavioral changes in aging female C57BL/6 mice. *Neurobiol Aging* 32, 1868-80.

Falkenberg T, Mohammed AK, Henriksson B, Persson H, Winblad B, Lindfors N. 1992. Increased expression of brain-derived neurotrophic factor mRNA in rat hippocampus is associated with improved spatial memory and enriched environment. *Neurosci Lett.* 138, 153-6.

Farlow M. 2002. A clinical overview of cholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease. *Int Psychogeriatr.* 1, 93-126.

Fassbender K, Simons M, Bergmann C, Stroick M, Lutjohann D, Keller P, Runz H, Kuhl S, Bertsch T, von Bergmann K, Hennerici M, Beyreuther K, Hartmann T. 2001 Simvastatin strongly reduces levels of Alzheimer's disease beta -amyloid peptides Abeta 42 and Abeta 40 in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98, 5856-61.

Feng R, Rampon C, Tang YP, Shrom D, Jin J, Kyin M, Sopher B, Miller MW, Ware CB, Martin GM, Kim SH, Langdon RB, Sisodia SS, Tsien JZ. 2001. Deficient neurogenesis in forebrain-specific presenilin-1 knockout mice is associated with reduced clearance of hippocampal memory traces. *Neuron.* 32, 911-26.

Ferchmin PA, Eterovic VA, Caputto R. 1970. Studies of brain weight and RNA content after short periods of exposure to environmental complexity. *Brain Res.* 20, 49-57.

Fernández-Teruel A, Giménez-Llort L, Escorihuela RM, Gil L, Aguilar R, Steimer T, Tobeña A. 2002. Early-life handling stimulation and environmental enrichment: are some of their effects mediated by similar neural mechanisms? *Pharmacol. Biochem. Behav.* 73, 233-45.

Fernández-Teruel A, Escorihuela RM, Castellano B, González B, Tobeña A. 1997. Neonatal handling and environmental enrichment effects on emotionality, novelty/reward seeking, and age-related cognitive and hippocampal impairments: focus on the Roman rat lines. *Behav Genet.* 27, 513-26.

Fernández-Teruel A, Escorihuela RM, Boix F, Tobena A. 1991. Effects of different handling-stimulation procedures and benzodiazepines on two-way active avoidance acquisition in rats. *Pharmacol Res.* 24, 273-82.

Fernández-Teruel A, Escorihuela RM. 2000. Elementos de farmacología conductual: De la investigación básica a la integración con la terapia psicológica. Universidad Autónoma de Barcelona.

File SE, Wardill AG. 1975. Validity of head-dipping as a measure of exploration in a modified hole-board. *Psychopharmacologia*. 44, 53-9.

Fiserová A, Starec M, Kuldová M, Kovárů H, Páv M, Vannucci L, Pospíšil M. 2002. Effects of D2-dopamine and alpha-adrenoceptor antagonists in stress induced changes on immune responsiveness of mice. *J Neuroimmunol*. 130, 55-65.

Floeter MK, Greenough WT. 1979. Cerebellar plasticity: modification of Purkinje cell structure by differential rearing in monkeys. *Science*. 206, 227-9.

Forgays DG, Forgays JW. 1952. The nature of the effect of free-environmental experience in the rat. *J Comp Physiol Psychol*. 45, 322-8.

Forgays DG, Read JM. 1962. Crucial periods for free-environmental experience in the rat. *J Comp Physiol Psychol*. 55, 816-8.

Foster TC, Gagne J, Massicotte G. 1996. Mechanism of altered synaptic strength due to experience: relation to long-term potentiation. *Brain Res*. 736, 243-50.

Foster TC, Dumas TC. 2001. Mechanism for increased hippocampal synaptic strength following differential experience. *J Neurophysiol*. 85, 1377-83.

Fratiglioni L, Viitanen M, von Strauss E, Tontodonati V, Herlitz A, Winblad B. 1997. Very old women at highest risk of dementia and Alzheimer's disease: incidence data from the Kungsholmen Project, Stockholm. *Neurology*. 48, 132-8.

Fratiglioni L, Paillard-Borg S, Winblad B. 2004. An active and socially integrated lifestyle in late life might protect against dementia. *Lancet Neurol.* 3, 343-53.

Fratiglioni L, Wang HX. 2007. Brain reserve hypothesis in dementia. *J Alzheimers Dis.* 12, 11-22.

Freeman BJ, Ray OS. 1972. Strain, sex, and environment effects on appetitively and aversively motivated learning tasks. *Dev Psychobiol.* 5, 101-9.

Frick KM, Fernandez SM. 2003. Enrichment enhances spatial memory and increases synaptophysin levels in aged female mice. *Neurobiol Aging.* 24, 615-26.

Friedland RP, Fritsch T, Smyth KA, Koss E, Lerner AJ, Chen CH, Petot GJ, Debanne SM. 2001. Patients with Alzheimer's disease have reduced activities in midlife compared with healthy control-group members. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98, 3440-5.

Friske JE, Gammie SC. 2005. Environmental enrichment alters plus maze, but not maternal defense performance in mice. *Physiol Behav.* 85, 187-94.

Gabuzda D, Busciglio J, Chen LB, Matsudaira P, Yankner BA. 1994. Inhibition of energy metabolism alters the processing of amyloid precursor protein and induces a potentially amyloidogenic derivative. *J Biol Chem.* 269, 13623-8.

Games D, Adams D, Alessandrini R, Barbour R, Berthelette P, Blackwell C, Carr T, Clemens J, Donaldson T, Gillespie F, et al. 1995. Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein. *Nature.* 373, 523-7.

Gandy S, Duff K. 2000. Post-menopausal estrogen deprivation and Alzheimer's disease. *Exp Gerontol.* 35, 503-11.

Gao S, Hendrie HC, Hall KS, Hui S. 1998. The relationships between age, sex, and the incidence of dementia and Alzheimer disease: a meta-analysis. *Arch Gen Psychiatry.* 55, 809-15.

García-Mesa Y, López-Ramos JC, Giménez-Llort L, Revilla S, Guerra R, Gruart A, Laferla FM, Cristòfol R, Delgado-García JM, Sanfeliu C. 2011. Physical exercise protects against Alzheimer's disease in 3xTg-AD mice. *J Alzheimers Dis.* 24, 421-54.

García-Mesa Y, Giménez-Llort L, López LC, Venegas C, Cristòfol R, Escames G, Acuña-Castroviejo D, Sanfeliu C. 2011b. Melatonin plus physical exercise are highly neuroprotective in the 3xTg-AD mouse. *Neurobiol Aging.* [ahead of print].

Giménez-Llort L, Blázquez G, Cañete T, Johansson B, Oddo S, Tobeña A, LaFerla FM, Fernández-Teruel A. 2007 Modeling behavioral and neuronal symptoms of Alzheimer's disease in mice: a role for intraneuronal amyloid. *Neurosci Biobehav Rev.* 31, 125-47.

Giménez-Llort L, Fernández-Teruel A, Escorihuela RM, Fredholm BB, Tobeña A, Pekny M, Johansson B. 2002. Mice lacking the adenosine A1 receptor are anxious and aggressive, but are normal learners with reduced muscle strength and survival rate. *Eur. J. Neurosci.* 16, 547-50.

Giménez-Llort L, Masino SA, Diao L, Fernández-Teruel A, Tobeña A, Halldner L, Fredholm BB. 2005. Mice lacking the adenosine A1 receptor have normal spatial learning and plasticity in the CA1 region of the hippocampus, but they habituate more slowly. *Synapse.* 57, 8-16.

Giménez-Llort L, García Y, Buccieri K, Revilla S, Suñol C, Cristofol R, Sanfeliu C. 2010. Gender-Specific Neuroimmunoendocrine Response to Treadmill Exercise in 3xTg-AD Mice. *Int J Alzheimers Dis.* 2010:128354.

Giménez-Llort L, Arranz L, Maté I, De la Fuente M. 2008. Gender-specific neuroimmunoendocrine aging in a triple-transgenic 3xTg-AD mouse model for Alzheimer's disease and its relation with longevity. *Neuroimmunomodulation.* 15, 331-43.

Gobbo OL, O'Mara SM. 2004. Impact of enriched-environment housing on brain-derived neurotrophic factor and on cognitive performance after a transient global ischemia. *Behav Brain Res.* 152, 231-41.

Gómez-Isla T, Hollister R, West H, Mui S, Growdon JH, Petersen RC, Parisi JE, Hyman BT. 1997. Neuronal loss correlates with but exceeds neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Ann Neurol.* 41, 17-24.

Götz J, Chen F, van Dorpe J, Nitsch RM. 2001. Formation of neurofibrillary tangles in P301l tau transgenic mice induced by Abeta 42 fibrils. *Science.* 293, 1491-5.

Görtz N, Lewejohann L, Tomm M, Ambrée O, Keyvani K, Paulus W, Sachser N. 2008. Effects of environmental enrichment on exploration, anxiety, and memory in female TgCRND8 Alzheimer mice. *Behav Brain Res.* 191, 43-8.

Gouras GK, Tsai J, Naslund J, Vincent B, Edgar M, Checler F, Greenfield JP, Haroutunian V, Buxbaum JD, Xu H, Greengard P, Relkin NR. 2000. Intraneuronal Abeta42 accumulation in human brain. *Am. J. Pathol.* 156, 15-20.

Green EJ, Greenough WT. 1986. Altered synaptic transmission in dentate gyrus of rats reared in complex environments: evidence from hippocampal slices maintained in vitro. *J Neurophysiol.* 55, 739-50.

Green KN, LaFerla FM. 2008. Linking calcium to Abeta and Alzheimer's disease. *Neuron.* 59, 190-4.

Greenough WT, Volkmar FR, Juraska JM. 1973. Effects of rearing complexity on dendritic branching in frontolateral and temporal cortex of the rat. *Exp Neurol.* 41, 371-8.

Greenwood CE, Tam C, Chan M, Young KW, Binns MA, van Reekum R. 2005. Behavioral disturbances, not cognitive deterioration, are associated with altered food selection in seniors with Alzheimer's disease. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 60, 499-505.

Griebel G, Belzung C, Perrault G, Sanger DJ. 2000. Differences in anxiety-related behaviours and in sensitivity to diazepam in inbred and outbred strains of mice. *Psychopharmacology (Berl).* 148, 164-70.

Guérin D, Sacquet J, Mandairon N, Jourdan F, Didier A. 2009. Early locus coeruleus degeneration and olfactory dysfunctions in Tg2576 mice. *Neurobiol Aging.* 30, 272-83.

Gulinello M, Gertner M, Mendoza G, Schoenfeld BP, Oddo S, LaFerla F, Choi CH, McBride SM, Faber DS. 2009. Validation of a 2-day water maze protocol in mice. *Behav Brain Res.* 196, 220-7.

Gyure KA, Durham R, Stewart WF, Smialek JE, Troncoso JC. 2001. Intraneuronal abeta-amyloid precedes development of amyloid plaques in Down syndrome. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 125, 489-92.

Haas C, Hung AY, Citron M, Teplow DB, Selkoe DJ. 1995. beta-Amyloid, protein processing and Alzheimer's disease. *Arzneimittelforschung*. 45, 398-402.

Hardy J. 1997. Amyloid, the presenilins and Alzheimer's disease. *Trends Neurosci*. 20, 154-9.

Hargreaves EL, Boom F, Cain DP. 1992. Rats housed in a complex environment exhibit greater hilar LTP than individually housed littermates. *Soc Neurosci Abstr*. 93, 91-8.

Harker KT, Wishaw IQ. 2002. Place and matching-to-place spatial learning affected by rat inbreeding (Dark-Agouti, Fischer 344) and albinism (Wistar, Sprague-Dawley) but not domestication (wild rat vs. Long-Evans, Fischer-Norway). *Behav Brain Res*. 134, 467-77.

Hatzinger M, Z'Brun A, Hemmeter U, Seifritz E, Baumann F, Holsboer-Trachsler E, Heuser IJ. 1995. Hypothalamic-pituitary-adrenal system function in patients with Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 16, 205-9.

Helzner EP, Scarmeas N, Cosentino S, Portet F, Stern Y. 2007. Leisure activity and cognitive decline in incident Alzheimer disease. *Arch Neurol*. 64, 1749-54.

Hémar A, Mulle C. 2011. Alzheimer's disease, amyloid peptide and synaptic dysfunction. *Med Sci (Paris)*. 27, 733-6.

Hernández F, Avila J. 2007. Tauopathies. *Cell Mol Life Sci*. 64, 2219-33.

Herman JP, Schäfer MK, Young EA, Thompson R, Douglass J, Akil H, Watson SJ. 1989. Evidence for hippocampal regulation of neuroendocrine neurons of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *J Neurosci*. 9, 3072-82.

Herring A, Lewejohann L, Panzer AL, Donath A, Kröll O, Sachser N, Paulus W, Keyvani K. 2011. Preventive and therapeutic types of environmental enrichment counteract beta amyloid pathology by different molecular mechanisms. *Neurobiol* 42, 530-8.

Herring A, Ambrée O, Tomm M, Habermann H, Sachser N, Paulus W, Keyvani K. 2009. Environmental enrichment enhances cellular plasticity in transgenic mice with Alzheimer-like pathology. *Exp Neurol* 216, 184-92.

Herring A, Yasin H, Ambrée O, Sachser N, Paulus W, Keyvani K. 2008. Environmental enrichment counteracts Alzheimer's neurovascular dysfunction in TgCRND8 mice. *Brain Pathol.* 18, 32-9.

Herring A, Blome M, Ambrée O, Sachser N, Paulus W, Keyvani K. 2010. Reduction of cerebral oxidative stress following environmental enrichment in mice with Alzheimer-like pathology. *Brain Pathol.* 20,166-75.

Heuser IJ, Gotthardt U, Schweiger U, Schmider J, Lammers CH, Dettling M, Holsboer F. 1994. Age-associated changes of pituitary-adrenocortical hormone regulation in humans: importance of gender. *Neurobiol Aging.* 15, 227-31.

Hines DJ, 2002. THE ROLE OF CUES AND THE HIPPOCAMPUS IN HOME BASE BEHAVIOUR. University of Lethbridge, Alberta, Canada.

Hirata-Fukae C, Li HF, Hoe HS, Gray AJ, Minami SS, Hamada K, Niikura T, Hua F, Tsukagoshi-Nagai H, Horikoshi-Sakuraba Y, Mughal M, Rebeck GW, LaFerla FM, Mattson MP, Iwata N, Saido TC, Klein WL, Duff KE, Aisen PS, Matsuoka Y. 2008. Females exhibit more extensive amyloid, but not tau, pathology in an Alzheimer transgenic model. *Brain Res.* 1216, 92-103.

Hodges JR, Salmon DP, Butters N. 1992. Semantic memory impairment in Alzheimer's disease: failure of access or degraded knowledge. *Neuropsychologia* 30, 301-14.

Hogervorst E, Bandelow S, Moffat SD. 2005. Increasing testosterone levels and effects on cognitive functions in elderly men and women: a review. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord.* 4, 531-40.

Holcomb LA, Gordon MN, Jantzen P, Hsiao K, Duff K, Morgan D. 1999. Behavioral changes in transgenic mice expressing both amyloid precursor protein and presenilin-1 mutations: lack of association with amyloid deposits. *Behav. Genet.* 29, 177-85.

Hoozemans JJ, Veerhuis R, Van Haastert ES, Rozemuller JM, Baas F, Eikelenboom P, Scheper W. 2005. The unfolded protein response is activated in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 110, 165-72

Hope T, Keene J, Gedling K, Fairburn CG, Jacoby R. 1998. Predictors of institutionalization for people with dementia living at home with a carer. *Int. J. Geriatr. Psychiatry,* 13:682-90.

Hsiao K, Chapman P, Nilsen S, Eckman C, Harigaya Y, Younkin S, Yang F, Cole G. 1996. Correlative memory deficits, Abeta elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science.* 274, 99-102.

Hsiung GY, Sadovnick AD, Feldman H. 2004. Apolipoprotein E epsilon4 genotype as a risk factor for cognitive decline and dementia: data from the Canadian Study of Health and Aging. *CMAJ.* 171, 863-7.

Hu YS, Xu P, Pigino G, Brady ST, Larson J, Lazarov O. 2010. Complex environment experience rescues impaired neurogenesis, enhances synaptic plasticity, and attenuates neuropathology in familial Alzheimer's disease-linked APP^{swe}/PS1^{DeltaE9} mice. *FASEB J.* 24, 1667-81.

Huang J, Guan H, Booze RM, Eckman CB, Hersh LB. 2004. Estrogen regulates neprilysin activity in rat brain. *Neurosci Lett.* 367, 85-7.

Huang TL, Zandi PP, Tucker KL, Fitzpatrick AL, Kuller LH, Fried LP, Burke GL, Carlson MC. 2005. Benefits of fatty fish on dementia risk are stronger for those without APOE epsilon4. *Neurology.* 65, 1409-14.

Hutton M, Hardy J. 1997. The presenilins and Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet.* 6, 1639-46.

Hy LX, Keller DM. 2000. Prevalence of AD among whites: a summary by levels of severity. *Neurology.* 55, 198-204.

Ickes BR, Pham TM, Sanders LA, Albeck DS, Mohammed AH, Granholm AC. 2000. Long-term environmental enrichment leads to regional increases in neurotrophin levels in rat brain. *Exp Neurol.* 164, 45-52.

Iqbal K, Alonso Adel C, Chen S, Chohan MO, El-Akkad E, Gong CX, Khatoon S, Li B, Liu F, Rahman A, Tanimukai H, Grundke-Iqbal I. 2005. Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies. *Biochim Biophys Acta* 1739, 198-210.

Isaacs KR, Anderson BJ, Alcantara AA, Black JE, Greenough WT. 1992. Exercise and the brain: angiogenesis in the adult rat cerebellum after vigorous physical activity and motor skill learning. *J Cereb Blood Flow Metab.* 12, 110-9.

Iwata N, Takaki Y, Fukami S, Tsubuki S, Saido TC. 2002. Region-specific reduction of A beta-degrading endopeptidase, neprilysin, in mouse hippocampus upon aging. *J Neurosci Res.* 70, 493-500.

Jankowsky JL, Melnikova T, Fadale DJ, Xu GM, Slunt HH, Gonzales V, Younkin LH, Younkin SG, Borchelt DR, Savonenko AV. 2005. Environmental enrichment mitigates cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 25, 5217-24.

Jankowsky JL, Xu G, Fromholt D, Gonzales V, Borchelt DR. 2003. Environmental enrichment exacerbates amyloid plaque formation in a transgenic mouse model of Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* 62, 1220-7.

Janus C, Westaway D. 2001. Transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *Physiol. Behav.* 73, 873-886.

Johansson B, Halldner L, Dunwiddie TV, Masino SA, Poelchen W, Giménez-Llort L, Escorihuela RM, Fernández-Teruel A, Wiesenfeld-Hallin Z, Xu XJ, Hardemark A, Betsholtz C, Herlenius E, Fredholm BB. 2001. Hyperalgesia, anxiety, and decreased hypoxic neuroprotection in mice lacking the adenosine A1 receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 98, 9407-12.

Johansson BB, Ohlsson AL. 1996. Environment, social interaction, and physical activity as determinants of functional outcome after cerebral infarction in the rat. *Exp Neurol.* 139, 322-7.

Jorm AF, Korten AE, Henderson AS. 1987. The prevalence of dementia: a quantitative integration of the literature. *Acta Psychiatr Scand.* 76, 465-79.

Juraska JM, Meyer M. 1986. Behavioral interactions of postweaning male and female rats with a complex environment. *Dev Psychobiol.* 19, 493-500.

Kaczmarek M, Skrzypczak M, Szwed A, Goździcka-Józefiak A, Geppert A. 2008. Assessment of the cognitive, functioning and emotional impairments in patients with Alzheimer's disease in relation to lifestyle behaviours in the stage of life prior to the diagnosis of disease. *Psychiatr Pol.* 42, 405-15.

Kalmijn S, Launer LJ, Ott A, Witteman JC, Hofman A, Breteler MM. *Ann Neurol.* 1997. Dietary fat intake and the risk of incident dementia in the Rotterdam Study. 42, 776-82.

Kayed R, Head E, Thompson JL, McIntire TM, Milton SC, Cotman CW, Glabe CG. 2003. Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science.* 300, 486-9.

Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH. 1997. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature.* 386, 493-5.

Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH. 1998a. Experience-induced neurogenesis in the senescent dentate gyrus. *J Neurosci.* 18, 3206-12.

Kempermann G, Brandon EP, Gage FH. 1998b. Environmental stimulation of 129/SvJ mice causes increased cell proliferation and neurogenesis in the adult dentate gyrus. *Curr Biol.* 8, 939-42.

Kempermann G, Gast D, Gage FH. 2002. Neuroplasticity in old age: sustained fivefold induction of hippocampal neurogenesis by long-term environmental enrichment. *Ann Neurol.* 52, 135-43.

Khlistunova I, Biernat J, Wang Y, Pickhardt M, von Bergen M, Gazova Z, Mandelkow E, Mandelkow EM. 2006. Inducible expression of Tau repeat domain in cell models of tauopathy: aggregation is toxic to cells but can be reversed by inhibitor drugs. *J Biol Chem.* 281, 1205-14.

Kimberly WT, Zheng JB, Guénette SY, Selkoe DJ. 2001. The intracellular domain of the beta-amyloid precursor protein is stabilized by Fe65 and translocates to the nucleus in a notch-like manner. *J Biol Chem.* 276, 40288-92.

King DL, Arendash GW, Crawford F, Sterk T, Menendez J, Mullan MJ. 1999. Progressive and gender-dependent cognitive impairment in the APPsw transgenic mouse model for Alzheimer's disease. *Behav. Brain Res.*, 103, 145-62.

King DL, Arendash GW. 2002. Maintained synaptophysin immunoreactivity in Tg2576 transgenic mice during aging: correlations with cognitive impairment. *Brain Res.* 926, 58-68.

Kitazawa M, Oddo S, Yamasaki TR, Green KN, LaFerla FM. 2005. Lipopolysaccharide-induced inflammation exacerbates tau pathology by a cyclin-dependent kinase 5-mediated pathway in a transgenic model of Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 25, 8843-53.

Kobayashi K, Ikeda Y, Suzuki H. 2006. Locomotor activity correlates with modifications of hippocampal mossy fibre synaptic transmission. *Eur J Neurosci.* 24, 1867-73.

Koistinaho M, Ort M, Cimadevilla JM, Vondrous R, Cordell B, Koistinaho J, Bures J, Higgins LS. 2001. Specific spatial learning deficits become severe with age in beta -amyloid precursor protein transgenic mice that harbor diffuse beta -amyloid deposits but do not form plaques. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98, 14675-80.

Krech D, Rosenzweig MR, Bennett EL. 1962. Relations between chemistry and problem-solving among rats raised in enriched and impoverished environments. *J Comp Physiol Psychol.* 55, 801-7.

Kronenberg G, Bick-Sander A, Bunk E, Wolf C, Ehninger D, Kempermann G. 2006. Physical exercise prevents age-related decline in precursor cell activity in the mouse dentate gyrus. *Neurobiol Aging*. 27, 1505-13.

Kuo YM, Emmerling MR, Bisgaier CL, Essenburg AD, Lampert HC, Drumm D, Roher AE. 1998. Elevated low-density lipoprotein in Alzheimer's disease correlates with brain abeta 1-42 levels. *Biochem Biophys Res Commun*. 252, 711-5.

LaFerla FM, Green KN, Oddo S. 2007. Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci*. 8, 499-509.

LaFerla FM, Oddo S. 2005. Alzheimer's disease: Abeta, tau and synaptic dysfunction. *Trends Mol Med*. 11, 170-6.

LaFerla FM. 2010. Pathways linking Abeta and tau pathologies. *Biochem Soc Trans*. 38, 993-5.

Lahiani-Cohen I, Lourbopoulos A, Haber E, Rozenstein-Tsalkovich L, Abramsky O, Grigoriadis N, Rosenmann H. 2011. Moderate environmental enrichment mitigates tauopathy in a neurofibrillary tangle mouse model. *J Neuropathol Exp Neurol*. 70, 610-21.

Lalonde R, Dumont M, Sturchler-Pierrat C, Staufenbiel M, Strazielle C. 2002. Spatial learning, exploration, anxiety, and motor coordination in female APP23 transgenic mice with the Swedish mutation. *Brain Res*. 956, 36-44.

Lalonde R, Lewis TL, Strazielle C, Kim H, Fukuchi K. 2003a. Transgenic mice expressing the betaAPP695SWE mutation: effects on exploratory activity, anxiety, and motor coordination. *Brain Res*. 977, 38-45.

Lalonde R, Qian S, Strazielle C. 2003b. Transgenic mice expressing the PS1-A246E mutation: effects on spatial learning, exploration, anxiety and motor coordination. *Behav. Brain. Res.* 138, 71-79.

Lambert MP, Barlow AK, Chromy BA, Edwards C, Freed R, Liosatos M, Morgan TE, Rozovsky I, Trommer B, Viola KL, Wals P, Zhang C, Finch CE, Krafft GA, Klein WL. 1998. Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95, 6448-53.

Lambert TJ, Fernandez SM, Frick KM. 2005. Different types of environmental enrichment have discrepant effects on spatial memory and synaptophysin levels in female mice. *Neurobiol Learn Mem.* 83, 206-16.

Larsson F, Winblad B, Mohammed AH. 2002. Psychological stress and environmental adaptation in enriched vs. impoverished housed rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 73, 193-207.

Laurin D, Verreault R, Lindsay J, MacPherson K, Rockwood K. 2001. Physical activity and risk of cognitive impairment and dementia in elderly persons. *Arch Neurol.* 58, 498-504.

Laurin D, Masaki KH, Foley DJ, White LR, Launer LJ. 2004. Midlife dietary intake of antioxidants and risk of late-life incident dementia: the Honolulu-Asia Aging Study. *Am J Epidemiol.* 159, 959-67.

Laviola G, Hannan AJ, Macrì S, Solinas M, Jaber M. 2008. Effects of enriched environment on animal models of neurodegenerative diseases and psychiatric disorders. *Neurobiol Dis.* 31, 159-68.

Lazarov O, Robinson J, Tang YP, Hairston IS, Korade-Mirnic Z, Lee VM, Hersh LB, Sapolsky RM, Mirnic K, Sisodia SS. 2005. Environmental enrichment reduces Abeta levels and amyloid deposition in transgenic mice. *Cell*. 120, 701-13.

Lazarov O, Mattson MP, Peterson DA, Pimplikar SW, van Praag H. 2010. When neurogenesis encounters aging and disease. *Trends Neurosci*. 33, 569-79.

Lazarov O, Marr RA. 2010b. Neurogenesis and Alzheimer's disease: at the crossroads. *Exp Neurol*. 223, 267-81.

Lee EH, Hsu WL, Ma YL, Lee PJ, Chao CC. 2003. Enrichment enhances the expression of *sgk*, a glucocorticoid-induced gene, and facilitates spatial learning through glutamate AMPA receptor mediation. *Eur J Neurosci*. 18, 2842-52.

Lee J, Duan W, Mattson MP. 2002. Evidence that brain-derived neurotrophic factor is required for basal neurogenesis and mediates, in part, the enhancement of neurogenesis by dietary restriction in the hippocampus of adult mice. *J Neurochem*. 82, 1367-75.

Lee KW, Lee SH, Kim H, Song JS, Yang SD, Paik SG, Han PL. 2004. Progressive cognitive impairment and anxiety induction in the absence of plaque deposition in C57BL/6 inbred mice expressing transgenic amyloid precursor protein. *J. Neurosci. Res*. 76, 572-80.

Lee VM, Goedert M, Trojanowski JQ. 2001. Neurodegenerative tauopathies. *Annu Rev Neurosci* 24, 1121-59.

Leggio MG, Mandolesi L, Federico F, Spirito F, Ricci B, Gelfo F, Petrosini L. 2005. Environmental enrichment promotes improved spatial abilities and enhanced dendritic growth in the rat. *Behav Brain Res.* 163, 78-90.

Lei ZM, Rao CV, Kornyei JL, Licht P, Hiatt ES. 1993. Novel expression of human chorionic gonadotropin/luteinizing hormone receptor gene in brain. *Endocrinology.* 132, 2262-70.

Leighty RE, Nilsson LN, Potter H, Costa DA, Low MA, Bales KR, Paul SM, Arendash GW. 2004. Use of multivariate statistical analysis to characterize and discriminate between the performance of four Alzheimer's transgenic mouse lines differing in A β deposition. *Behav. Brain Res.* 153, 107-21.

Levi O, Jongen-Relo AL, Feldon J, Roses AD, Michaelson DM. 2003. ApoE4 impairs hippocampal plasticity isoform-specifically and blocks the environmental stimulation of synaptogenesis and memory. *Neurobiol Dis.* 13, 273-82.

Levi O, Michaelson DM. 2007. Environmental enrichment stimulates neurogenesis in apolipoprotein E3 and neuronal apoptosis in apolipoprotein E4 transgenic mice. *J Neurochem.* 100, 202-10.

Levy-Lahad E, Wasco W, Poorkaj P, Romano DM, Oshima J, Pettingell WH, Yu CE, Jondro PD, Schmidt SD, Wang K, et al. 1995. Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science.* 269, 973-7.

Lewis J, McGowan E, Rockwood J, Melrose H, Nacharaju P, Van Slegtenhorst M, Gwinn-Hardy K, Paul Murphy M, Baker M, Yu X, Duff K, Hardy J, Corral A, Lin WL, Yen SH, Dickson DW, Davies P, Hutton M. 2000. Neurofibrillary tangles, amyotrophy and progressive motor disturbance in mice expressing mutant (P301L) tau protein. *Nat Genet.* 25, 402-5.

Lewis J, Dickson DW, Lin WL, Chisholm L, Corral A, Jones G, Yen SH, Sahara N, Skipper L, Yager D, Eckman C, Hardy J, Hutton M, McGowan E. 2001. Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP. *Science*. 293, 1487-91.

Lin EJ, Choi E, Liu X, Martin A, During MJ. 2011. Environmental enrichment exerts sex-specific effects on emotionality in C57BL/6J mice. *Behav Brain Res*. 216, 349-57.

Lister JP, Barnes CA. 2009. Neurobiological changes in the hippocampus during normative aging. *Arch Neurol* 66, 829-33.

Liu H, Zhao G, Cai K, Zhao H, Shi L. 2011. Treadmill exercise prevents decline in spatial learning and memory in APP/PS1transgenic mice through improvement of hippocampal long-term potentiation. *Behavioural Brain Research*. 218, 308-314.

López Salom M, Morelli L, Castaño EM, Soto EF, Pasquini JM. 2000. Defective ubiquitination of cerebral proteins in Alzheimer's disease. *J Neurosci Res*. 62, 302-10.

Lord A, Kalimo H, Eckman C, Zhang XQ, Lannfelt L, Nilsson LN. 2006. The Arctic Alzheimer mutation facilitates early intraneuronal Abeta aggregation and senile plaque formation in transgenic mice. *Neurobiol Aging*. 27, 67-77.

Luchsinger JA, Tang MX, Shea S, Mayeux R. 2003. Antioxidant vitamin intake and risk of Alzheimer disease. *Arch Neurol*. 60, 203-8.

Lukacs H, Hiatt ES, Lei ZM, Rao CV. 1995. Peripheral and intracerebroventricular administration of human chorionic gonadotropin alters several hippocampus-associated behaviors in cycling female rats. *Horm Behav.* 29, 42-58.

Martin M, Iyadurai SJ, Gassman A, Gindhart JG Jr, Hays TS, Saxton WM. 1999. Cytoplasmic dynein, the dynactin complex, and kinesin are interdependent and essential for fast axonal transport. *Mol Biol Cell.* 10, 3717-28.

Marx J. 2005. Neuroscience. Preventing Alzheimer's: a lifelong commitment? *Science.* 309, 864-6.

Masaki KH, Losonczy KG, Izmirlian G, Foley DJ, Ross GW, Petrovitch H, Havlik R, White LR. 2000. Association of vitamin E and C supplement use with cognitive function and dementia in elderly men. *Neurology.* 54, 1265-72.

Masliah E, Rockenstein E. 2000. Genetically altered transgenic models of Alzheimer's disease. *J. Neural Transm. Suppl.* 59, 175-83.

Mattson MP, Duan W, Lee J, Guo Z. 2001. Suppression of brain aging and neurodegenerative disorders by dietary restriction and environmental enrichment: molecular mechanisms. *Mech Ageing Dev.* 122, 757-78.

Mattson MP, Guo Q. 1997. Cell and molecular neurobiology of presenilins: a role for the endoplasmic reticulum in the pathogenesis of Alzheimer's disease? *J Neurosci Res.* 50, 505-13.

Mattson MP. 2003. Gene-diet interactions in brain aging and neurodegenerative disorders. *Ann Intern Med.* 139, 441-4.

Mattson MP. 2004. Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature*. 430, 631-9.

Mayeux R. 2003. Epidemiology of neurodegeneration. *Annu Rev Neurosci*. 81-104.

McGeer PL, McGeer EG. 2002. Local neuroinflammation and the progression of Alzheimer's disease. *J Neurovirol*. 8, 529-38.

Medeiros R, Baglietto-Vargas D, LaFerla FM. 2010. The Role of Tau in Alzheimer's Disease and Related Disorders. *CNS Neurosci Ther*. (ahead of print).

Meshi D, Drew MR, Saxe M, Ansorge MS, David D, Santarelli L, Malapani C, Moore H, Hen R. 2006. Hippocampal neurogenesis is not required for behavioral effects of environmental enrichment. *Nat Neurosci*. 9, 729-31.

Meyer-Luehmann M, Stalder M, Herzig MC, Kaeser SA, Kohler E, Pfeifer M, Boncristiano S, Mathews PM, Mercken M, Abramowski D, Staufenbiel M, Jucker M. 2003. Extracellular amyloid formation and associated pathology in neural grafts. *Nat Neurosci*. 6, 370-7.

Mirakhur A, Craig D, Hart DJ, McLlroy SP, Passmore AP. 2004. Behavioural and psychological syndromes in Alzheimer's disease. *Int. J. Geriatr. Psychiatry*. 19, 1035-9.

Mirochnic S, Wolf S, Staufenbiel M, Kempermann G. 2009. Age effects on the regulation of adult hippocampal neurogenesis by physical activity and environmental enrichment in the APP23 mouse model of Alzheimer disease. *Hippocampus*. 19, 1008-18.

Mocchegiani E, Malavolta M. 2004. NK and NKT cell functions in immunosenescence. *Aging Cell* 3, 177-84.

Mochizuki A, Tamaoka A, Shimohata A, Komatsuzaki Y, Shoji S. 2000. Abeta42-positive non-pyramidal neurons around amyloid plaques in Alzheimer's disease. *Lancet*. 355, 42-43.

Moechars D, Dewachter I, Lorent K, Reverse D, Baekelandt V, Naidu A, Tesseur I, Spittaels K, Haute CV, Checler F, Godaux E, Cordell B, van Leuven F. 1999. Early phenotypic changes in transgenic mice that overexpress different mutants of amyloid precursor protein in brain. *J. Biol. Chem.* 274, 6483-92.

Mohammed AH, Zhu SW, Darmopil S, Hjerling-Leffler J, Ernfors P, Winblad B, Diamond MC, Eriksson PS, Bogdanovic N. 2002. Environmental enrichment and the brain. *Prog Brain Res.* 138:109-33.

Mohammed AH, Henriksson BG, Söderström S, Ebendal T, Olsson T, Seckl JR. 1993. Environmental influences on the central nervous system and their implications for the aging rat. *Behav Brain Res.* 57, 183-91.

Mohammed AK, Winblad B, Ebendal T, Lärkfors L. 1990. Environmental influence on behaviour and nerve growth factor in the brain. *Brain Res.* 528, 62-72.

Mölsä PK, Marttila RJ, Rinne UK. 1982 Epidemiology of dementia in a Finnish population. *Acta Neurol Scand.* 65, 541-52.

Moran PM, Higgins LS, Cordell B, Moser PC. 1995. Age-related learning deficits in transgenic mice expressing the 751-amino acid isoform of human β -amiloide precursor protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 5341-5345.

Morgan D, Diamond DM, Gottschall PE, Ugen KE, Dickey C, Hardy J, Duff K, Jantzen P, DiCarlo G, Wilcock D, Connor K, Hatcher J, Hope C, Gordon M, Arendash GW. 2000. A beta peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimer's disease. *Nature*. 408, 982-5.

Mori C, Spooner ET, Wisniewsk KE, Wisniewski TM, Yamaguch H, Saido TC, Tolan DR, Selkoe DJ, Lemere CA. 2002. Intraneuronal Abeta42 accumulation in Down syndrome brain. *Amyloid* 9, 88-102.

Morris MC, Evans DA, Bienias JL, Tangney CC, Bennett DA, Aggarwal N, Wilson RS, Scherr PA. 2002. Dietary intake of antioxidant nutrients and the risk of incident Alzheimer disease in a biracial community study. *JAMA*. 287, 3230-7.

Morris MC. 2009. The role of nutrition in Alzheimer's disease: epidemiological evidence. *Eur J Neurol*. 16 Suppl 1:1-7.

Morris RGM, Anderson E, Lynch GS, Baudry M. 1986. Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartat receptor antagonist, AP5. *Neture* 319, 774-6.

Morris RGM. 1983. An attempt to dissociate 'spatial mapping' and 'working-memory' theories of hippocampal function. In: Siefert W, editor. *Neurobiology of the hippocampus*. London: Academic Press, pag. 405-32.

Morris RGM. 1981. Spatial localization does not require the presence of local cues. *Learn Motiv*. 12, 239-260.

Morris RG. 1999. *D.O. Hebb: The Organization of Behavior*, Wiley: New York; 1949. *Brain Res Bull*. 50, 437.

Morris R. 1984. Developments of water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods*. 11, 47-60.

Morrisette DA, Parachikova A, Green KN, LaFerla FM. 2009. Relevance of transgenic mouse models to human Alzheimer disease. *J Biol Chem*. 284, 6033-7.

Moser MB, Trommald M, Egeland T, Andersen P. 1997. Spatial training in a complex environment and isolation alter the spine distribution differently in rat CA1 pyramidal cells. *J Comp Neurol*. 380, 373-81.

Mucke L, Masliah E, Johnson WB, Ruppe MD, Alford M, Rockenstein EM, Forss-Petter S, Pietropaolo M, Mallory M, Abraham CR. 1994. Synaptotrophic effects of human amyloid beta protein precursors in the cortex of transgenic mice. *Brain Res*. 666,151-67.

Mucke L, Masliah E, Yu GQ, Mallory M, Rockenstein EM, Tatsuno G, Hu K, Kholodenko D, Johnson-Wood K, McConlogue L. 2000. High-level neuronal expression of abeta 1-42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation. *J Neurosci* Jun 20, 4050-8.

Nagano S, Huang X, Moir RD, Payton SM, Tanzi RE, Bush AI. 2004. Peroxidase activity of cyclooxygenase-2 (COX-2) cross-links beta-amyloid (Abeta) and generates Abeta-COX-2 hetero-oligomers that are increased in Alzheimer's disease. *J Biol Chem*. 279, 14673-8.

Naisbitt S, Kim E, Tu JC, Xiao B, Sala C, Valtschanoff J, Weinberg RJ, Worley PF, Sheng M. 1999. Shank, a novel family of postsynaptic density proteins that binds to the NMDA receptor/PSD-95/GKAP complex and cortactin. *Neuron*. 23, 569-82.

Naka F, Narita N, Okado N, Narita M. 2005. Modification of AMPA receptor properties following environmental enrichment. *Brain Dev.* 27, 275-8.

Neeper SA, Gómez-Pinilla F, Choi J, Cotman C. 1995. Exercise and brain neurotrophins. *Nature.* 373, 109.

Nelson AP, O'Connor MG. 2008. Mild cognitive impairment: a neuropsychological perspective. *CNS Spectr.* 13, 56-64.

Nelson RL, Guo Z, Halagappa VM, Pearson M, Gray AJ, Matsuoka Y, Brown M, Martin B, Iyun T, Maudsley S, Clark RF, Mattson MP. 2007. Prophylactic treatment with paroxetine ameliorates behavioral deficits and retards the development of amyloid and tau pathologies in 3xTgAD mice. *Exp Neurol.* 205, 166-76.

Nichol K, Deeny SP, Seif J, Camaclang K, Cotman CW. 2009. Exercise improves cognition and hippocampal plasticity in APOE epsilon4 mice. *Alzheimers Dement* 5, 287-94.

Nithianantharajah J, Levis H, Murphy M. 2004. Environmental enrichment results in cortical and subcortical changes in levels of synaptophysin and PSD-95 proteins. *Neurobiol Learn Mem.* 81, 200-10.

Nithianantharajah J, Hannan AJ. 2006. Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system. *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 697-709.

Nomura Y, Okuma Y. 1999. Age-related defects in lifespan and learning ability in SAMP8 mice. *Neurobiol Aging.* 20, 111-5.

Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kaye R, Metherate R, Mattson MP, Akbari Y, LaFerla FM. 2003a. Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular A β and synaptic dysfunction. *Neuron*. 39, 409-21.

Oddo S, Caccamo A, Green KN, Liang K, Tran L, Chen Y, Leslie FM, LaFerla FM. 2005. Chronic nicotine administration exacerbates tau pathology in transgenic model of Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 3046-51.

Oddo S, Vasilevko V, Caccamo A, Kitazawa M, Cribbs DH, LaFerla FM. 2006a. Reduction of soluble Abeta and tau, but not soluble Abeta alone, ameliorates cognitive decline in transgenic mice with plaques and tangles. *J Biol Chem*. 281, 39413-23.

Oddo S, Caccamo A, Tran L, Lambert MP, Glabe CG, Klein WL, LaFerla FM. 2006b. Temporal profile of amyloid-beta (Abeta) oligomerization in an in vivo model of Alzheimer disease. A link between Abeta and tau pathology. *J Biol Chem*. Jan 281, 1599-604.

Oddo S, Caccamo A, Kitazawa M, Tseng BP, LaFerla FM. 2003b. Amyloid deposition precedes tangle formation in a triple transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 24, 1063-70.

Oddo S, Caccamo A, Cheng D, Juleh B, Torp R, LaFerla FM. 2007. Genetically augmenting tau levels does not modulate the onset or progression of Abeta pathology in transgenic mice. *J Neurochem*. 102, 1053-63.

Oddo S, Caccamo A, Cheng D, LaFerla FM. 2009. Genetically altering Abeta distribution from the brain to the vasculature ameliorates tau pathology. *Brain Pathol*. 19, 421-30.

O'Keefe J y Nadel L. 1978. The hippocampus as a cognitive map. Oxford: Oxford University Press.

Okuma Y, Nomura Y. 1998. Senescence-accelerated mouse (SAM) as an animal model of senile dementia: pharmacological, neurochemical and molecular biological approach. *Jpn J Pharmacol.* 78, 399-404.

O'Leary TP, Brown RE. 2009. Visuo-spatial learning and memory deficits on the Barnes maze in the 16-month-old APPswe/PS1dE9 mouse model of Alzheimer's disease. *Behav Brain Res.* 201, 120-7.

Olton DS, Papas BC. 1979. Spatial memory and hippocampal function. *Neuropsychologia.* 17, 669-82.

Pacteau C, Einon D, Sinden J. 1989. Early rearing environment and dorsal hippocampal ibotenic acid lesions: long-term influences on spatial learning and alternation in the rat. *Behav Brain Res.* 34, 79-96.

Panakhova E, Buresová O, Bures J. 1984. Persistence of spatial memory in the Morris water tank task. *Int J Psychophysiol* 2, 5-10.

Pardon MC, Sarmad S, Rattray I, Bates TE, Scullion GA, Marsden CA, Barrett DA, Lowe J, Kendall DA. 2009. Repeated novel cage exposure-induced improvement of early Alzheimer's-like cognitive and amyloid changes in TASTPM mice is unrelated to changes in brain endocannabinoids levels. *Neurobiol Aging.* 30, 1099-113.

Park GA, Pappas BA, Murtha SM, Ally A. 1992. Enriched environment primes forebrain choline acetyltransferase activity to respond to learning experience. *Neurosci Lett.* 143, 259-62.

Pascual R, Figueroa H. 1996. Effects of preweaning sensorimotor stimulation on behavioral and neuronal development in motor and visual cortex of the rat. *Biol Neonate*. 69, 399-404.

Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M, 1985. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J. Neurosci. Methods*. 14, 149-67.

Pellow S, File SE. 1986. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. *Pharmacol Biochem Behav*. 24, 525-9.

Peña Y, Prunell M, Dimitsantos V, Nadal R, Escorihuela RM. 2006. Environmental enrichment effects in social investigation in rats are gender dependent. *Behav Brain Res*. 174, 181-7.

Peña Y, Prunell M, Rotllant D, Armario A, Escorihuela RM. 2009. Enduring effects of environmental enrichment from weaning to adulthood on pituitary-adrenal function, pre-pulse inhibition and learning in male and female rats. *Psychoneuroendocrinology*. 34, 1390-404.

Perry RJ, Hodges JR. 1999. Attention and executive deficits in Alzheimer's disease. A critical review. *Brain* 122, 383-404.

Peskind ER, Raskind MA, Wingerson D, Pascualy M, Thal LJ, Dobie DJ, Wilkinson CW. 1996. Hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis responses to physostigmine: effects of Alzheimer's disease and gender. *Biol Psychiatry*. 40, 61-8.

Petrosini L, De Bartolo P, Foti F, Gelfo F, Cutuli D, Leggio MG, Mandolesi L. 2009. On whether the environmental enrichment may provide cognitive and brain reserves. *Brain Res Rev.* 61, 221-39.

Pham TM, Ickes B, Albeck D, Söderström S, Granholm AC, Mohammed AH. 1999. Changes in brain nerve growth factor levels and nerve growth factor receptors in rats exposed to environmental enrichment for one year. *Neuroscience.* 94, 279-86.

Pham TM, Winblad B, Granholm AC, Mohammed AH. 2002. Environmental influences on brain neurotrophins in rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 73, 167-75.

Piccininni M, Di Carlo A, Baldereschi M, Zaccara G, Inzitari D. 2005. Behavioral and psychological symptoms in Alzheimer's disease: frequency and relationship with duration and severity of the disease. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 19, 276-81.

Pietropaolo S, Branchi I, Cirulli F, Chiarotti F, Aloe L, Alleva E. 2004. Long-term effects of the periadolescent environment on exploratory activity and aggressive behaviour in mice: social versus physical enrichment. *Physiol Behav.* 81, 443-53.

Pietropaolo S, Feldon J, Alleva E, Cirulli F, Yee BK. 2006. The role of voluntary exercise in enriched rearing: a behavioral analysis. *Behav Neurosci.* 120, 787-803.

Pietropaolo S, Sun Y, Li R, Brana C, Feldon J, Yee BK. 2008. The impact of voluntary exercise on mental health in rodents: a neuroplasticity perspective. *Behav Brain Res.* 192, 42-60.

Pietro Paolo S, Sun Y, Li R, Brana C, Feldon J, Yee BK. 2009. Limited impact of social isolation on Alzheimer-like symptoms in a triple transgenic mouse model. *Behav Neurosci.* 123, 181-95.

Piquard A, Lacomblez L, Derouesné C, Siéoff E. 2009. Problems inhibiting attentional capture by irrelevant stimuli in patients with frontotemporal dementia. *Brain Cogn.* 70, 62-6.

Pitchumoni SS, Doraiswamy PM. 1998. Current status of antioxidant therapy for Alzheimer's Disease. *J Am Geriatr Soc.* 46, 1566-72.

Perry RJ, Hodges JR. 2000. Differentiating frontal and temporal variant frontotemporal dementia from Alzheimer's disease. *Neurology.* 54, 2277-84.

Pope SK, Shue VM, Beck C. 2003. Will a healthy lifestyle help prevent Alzheimer's disease? *Annu Rev Public Health.* 24:111-32.

Priller C, Bauer T, Mitteregger G, Krebs B, Kretschmar HA, Herms J., 2006. Synapse formation and function is modulated by the amyloid precursor protein. *J Neurosci.* 26, 7212-21.

Puglielli L, Tanzi RE, Kovacs DM. 2003. Alzheimer's disease: the cholesterol connection. *Nat Neurosci.* 6, 345-51.

Qian S, Jiang P, Guan XM, Singh G, Trumbauer ME, Yu H, Chen HY, Van de Ploeg LH, Zheng H. 1998. Mutant human presenilin 1 protects presenilin 1 null mouse against embryonic lethality and elevates Abeta1-42/43 expression. *Neuron.* 20, 611-7.

Querfurth HW, LaFerla FM. 2010. Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.* 326, 329-44.

Ramos A, Berton O, Mormède P, Chaouloff F. 1997. A multiple-test study of anxiety-related behaviours in six inbred rat strains. *Behav Brain Res.* 85, 57-69.

Rampon C, Jiang CH, Dong H, Tang YP, Lockhart DJ, Schultz PG, Tsien JZ, Hu Y. 2000a. Effects of environmental enrichment on gene expression in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97, 12880-4.

Rampon C, Tang YP, Goodhouse J, Shimizu E, Kyin M, Tsien JZ. 2000b. Enrichment induces structural changes and recovery from nonspatial memory deficits in CA1 NMDAR1-knockout mice. *Nat Neurosci.* 3, 238-44.

Rapoport M, Dawson HN, Binder LI, Vitek MP, Ferreira A. 2002. Tau is essential to beta -amyloid-induced neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99, 6364-9.

Ray OS, Hochhauser S. Growth hormone and environmental complexity effects on behaviour in the rat. 1969. *Dev Psychol.* 1, 311-7.

Redolat R, Mesa-Gresa P. 2011. Potential Benefits and Limitations of Enriched Environments and Cognitive Activity on Age-Related Behavioural Decline. *Curr Top Behav Neurosci.* [Epub ahead of print]

Richter H, Ambrée O, Lewejohann L, Herring A, Keyvani K, Paulus W, Palme R, Touma C, Schäbitz WR, Sachser N. 2008. Wheel-running in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease: protection or symptom? *Behav Brain Res.* 190, 74-84.

Rodgers RJ, Dalvi A. 1997. Anxiety, defence and the elevated plus-maze. *Neurosci Biobehav Rev.* 21, 801-10.

Rodríguez JJ, Jones VC, Tabuchi M, Allan SM, Knight EM, LaFerla FM, Oddo S, Verkhratsky A. 2008. Impaired adult neurogenesis in the dentate gyrus of a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *PLoS One*. 3, e2935.

Rosario ER, Carroll JC, Oddo S, LaFerla FM, Pike CJ. 2006. Androgens regulate the development of neuropathology in a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 26, 13384-9.

Roy V, Belzung C, Delarue C, Chapillon P. 2001. Environmental enrichment in BALB/c mice: effects in classical tests of anxiety and exposure to a predatory odor. *Physiol Behav*. 74, 313-20.

Reisberg B, Borenstein J, Salob SP, Ferris SH, Franssen E, Georgotas A. 1987. Behavioral symptoms in Alzheimer's disease. phenomenology and treatment. *J. Clin. Psychiatry* 48, 9-15.

Reitz C, Brayne C, Mayeux R. 2011. Epidemiology of Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol*. 7, 137-52.

Renner MJ, Rosenzweig MR. 1987. Enriched and impoverished environments. Effects on brain and behavior. New York: Springer-Verlag.

Roberson ED, Scarce-Levie K, Palop JJ, Yan F, Cheng IH, Wu T, Gerstein H, Yu GQ, Mucke L. 2007. Reducing endogenous tau ameliorates amyloid beta-induced deficits in an Alzheimer's disease mouse model. *Science*. 316, 750-4.

Roberts RO, Cerhan JR, Geda YE, Knopman DS, Cha RH, Christianson TJ, Pankratz VS, Ivnik RJ, O'Connor HM, Petersen RC. 2010. Polyunsaturated fatty acids and reduced odds of MCI: the Mayo Clinic Study of Aging. *J Alzheimers Dis*. 21, 853-65.

Romberg C, Mattson MP, Mughal MR, Bussey TJ, Saksida LM. 2011 Impaired attention in the 3xTgAD mouse model of Alzheimer's disease: rescue by donepezil (Aricept). *J Neurosci.* 31, 3500-7.

Rose FD, Dell Pa, Love S. 1985. Behavioral consequences of different types of environmental enrichment in the rat. *IRCS Med Sci* 19, 143-5.

Rosenzweig MR, Krech D, Bennett EL, Diamond MC. 1962. Effects of environmental complexity and training on brain chemistry and anatomy: a replication and extension. *J Comp Physiol Psychol.* 55, 429-37.

Rosenzweig MR, Bennett EL. 1972. Cerebral changes in rats exposed individually to an enriched environment. *J Comp Physiol Psychol.* 80, 304-13.

Rosenzweig MR. 1979. Responsiveness of brain size to individual experience: behavioural and evolutionary implications. In: Hahn ME, Jensen C, Dudeck BC, editors. *Development and evolution of brain size: behavioural implications.* New York: academic Press, 263-94.

Roses AD. 1994. Apolipoprotein E affects the rate of Alzheimer Disease expression: β -amyloid burden is a secondary consequence dependent on APOE genotype and duration of disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 53, 429-37.

Roses AD. 1997. A model for susceptibility polymorphisms for complex diseases: apolipoprotein E and Alzheimer disease. *Neurogenetics.* 1, 3-11.

Sandberg G, Stewart W, Smialek J, Troncoso JC. 2001. The prevalence of the neuropathological lesions of Alzheimer's disease is independent of race and gender. *Neurobiol Aging.* 22, 169-75.

Sandi C. Memory Impairments Associated with Stress and Aging. In: Bermúdez-Rattoni F, editor. *Neural Plasticity and Memory: From Genes to Brain Imaging*. Boca Raton (FL): CRC Press: 2007. Chapter 12.

Santacruz K, Lewis J, Spires T, Paulson J, Kotilinek L, Ingelsson M, Guimaraes A, DeTure M, Ramsden M, McGowan E, Forster C, Yue M, Orne J, Janus C, Mariash A, Kuskowski M, Hyman B, Hutton M, Ashe KH. 2005. Tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function. *Science*. 309, 476-81.

Savica R, Petersen RC. 2011. Prevention of dementia. *Psychiatr Clin North Am*. Mar;34(1):127-45.

Savonenko A, Xu GM, Melnikova T, Morton JL, Gonzales V, Wong MP, Price DL, Tang F, Markowska AL, Borchelt DR. 2005. Episodic-like memory deficits in the APP^{swe}/PS1^{dE9} mouse model of Alzheimer's disease: relationships to beta-amyloid deposition and neurotransmitter abnormalities. *Neurobiol Dis*. 18, 602-17.

Scarmeas N, Luchsinger JA, Schupf N, Brickman AM, Cosentino S, Tang MX, Stern Y. 2009. Physical activity, diet, and risk of Alzheimer disease. *JAMA*. 302, 627-37.

Scarmeas N, Stern Y, Mayeux R, Luchsinger JA. 2006. Mediterranean diet, Alzheimer disease, and vascular mediation. *Arch Neurol*. 63, 1709-17.

Schaefer EJ, Bongard V, Beiser AS, Lamon-Fava S, Robins SJ, Au R, Tucker KL, Kyle DJ, Wilson PW, Wolf PA. 2006. Plasma phosphatidylcholine docosahexaenoic acid content and risk of dementia and Alzheimer disease: the Framingham Heart Study. *Arch Neurol*. 63, 1545-50.

Schaeffer EL, Figueiro M, Gattaz WF. 2011. Insights into Alzheimer disease pathogenesis from studies in transgenic animal models. *Clinics (Sao Paulo)*.66 Suppl 1:45-54.

Schenk D, Barbour R, Dunn W, Gordon G, Grajeda H, Guido T, Hu K, Huang J, Johnson-Wood K, Khan K, Kholodenko D, Lee M, Liao Z, Schrijver NC, Bahr NI, Weiss IC, Würbel H. 2002. Dissociable effects of isolation rearing and environmental enrichment on exploration, spatial learning and HPA activity in adult rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 73, 209-24.

Schrijver NC, Bahr NI, Weiss IC, Würbel H. 2002. Dissociable effects of isolation rearing and environmental enrichment on exploration, spatial learning and HPA activity in adult rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 73, 209-24.

Segovia G, Yagüe AG, García-Verdugo JM, Mora F. 2006. Environmental enrichment promotes neurogenesis and changes the extracellular concentrations of glutamate and GABA in the hippocampus of aged rats. *Brain Res Bull.* 70, 8-14.

Segovia G, del Arco A, Mora F. 2009. Environmental enrichment, prefrontal cortex, stress, and aging of the brain. *J Neural Transm.* 116, 1007-16.

Selkoe DJ, Schenk D. 2003. Alzheimer's disease: molecular understanding predicts amyloid-based therapeutics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 43, 545-84.

Seymour P, Dou H, Juraska, JM. 1996. Sex differences in radial maze performance: influence of rearing environment and room cues. *Psychobiology.* 24, 33-37.

Sharp PE, McNaughton BL, Barnes CA. 1985. Enhancement of hippocampal field potentials in rats exposed to a novel, complex environment. *Brain Res.* 339, 361-5.

Sharpless NE, DePinho RA. 2007. How stem cells age and why this make us grow old. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8, 703-13.

Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Chi H, Lin C, Li G, Holman K, Tsuda T, Mar L, Foncin JF, Bruni AC, Montesi MP, Sorbi S, Rainero I, Pinessi L, Nee L, Chumakov I, Pollen D, Brookes A, Sanseau P, Polinsky RJ, Wasco W, Da Silva HA, Haines JL, Pericak-Vance MA, Tanzi RE, Roses AD, Fraser PE, Rommens JM, St George-Hyslop PH. 1995. Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature.* 375, 754-60.

Shinoda M, Miyazaki A, Toide K. 1999. Effect of a novel prolyl endopeptidase inhibitor, JTP-4819, on spatial memory and on cholinergic and peptidergic neurons in rats with ibotenate-induced lesions of the nucleus basalis magnocellularis. *Behav Brain Res.* 99, 17-25.

Simpson J, Kelly JP. 2011. The impact of environmental enrichment in laboratory rats--behavioural and neurochemical aspects. *Behav Brain Res.* 222, 246-64.

Sinforiani E, Citterio A, Zucchella C, Bono G, Corbetta S, Merlo P, Mauri M. 2010. Impact of gender differences on the outcome of Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 30, 147-54.

Smith JK, Neill JC, Costall B. 1997. Post-weaning housing conditions influence the behavioural effects of cocaine and d-amphetamine. *Psychopharmacology (Berl).* 131, 23-33.

Soffié M, Hahn K, Terao E, Eclancher F. 1999. Behavioural and glial changes in old rats following environmental enrichment. *Behav Brain Res.* 101, 37-49.

Solfrizzi V, Colacicco AM, D'Introno A, Capurso C, Torres F, Rizzo C, Capurso A, Panza F. 2006. Dietary intake of unsaturated fatty acids and age-related cognitive decline: a 8.5-year follow-up of the Italian Longitudinal Study on Aging. *Neurobiol Aging.* 27, 1694-704.

Solinas M, Thiriet N, Chauvet C, Jaber M. 2010. Prevention and treatment of drug addiction by environmental enrichment. *Prog Neurobiol.* 92, 572-92.

Steele RJ, Morris RG. 1999. Delay-dependent impairment of a matching-to-place task with chronic and intrahippocampal infusion of the NMDA-antagonist D-AP5. *Hippocampus.* 9, 118-36.

Stern Y, Gurland B, Tatemichi TK, Tang MX, Wilder D, Mayeux R. 1994. Influence of education and occupation on the incidence of Alzheimer's disease. *JAMA.* 271, 1004-10.

Sterniczuk R, Antle MC, Laferla FM, Dyck RH. 2010. Characterization of the 3xTg-AD mouse model of Alzheimer's disease: part 2. Behavioral and cognitive changes. *Brain Res.* 1348, 149-55

Streng J. 1971. Open-field behavior in four inbred mouse strains. *Can J Psychol.* 25, 62-8.

Sturchler-Pierrat C, Abramowski D, Duke M, Wiederhold KH, Mistl C, Rothacher S, Ledermann B, Bürki K, Frey P, Paganetti PA, Waridel C, Calhoun ME, Jucker M, Probst A, Staufenbiel M, Sommer B. 1997. Two amyloid precursor protein transgenic mouse models with Alzheimer disease-like pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94, 13287-92.

Sztainberg Y, Kuperman Y, Tsoory M, Lebow M, Chen A. 2010. The anxiolytic effect of environmental enrichment is mediated via amygdalar CRF receptor type 1. *Mol Psychiatry*. 15, 905-17.

Scheuner D, Eckman C, Jensen M, Song X, Citron M, Suzuki N, Bird TD, Hardy J, Hutton M, Kukull W, Larson E, Levy-Lahad E, Viitanen M, Peskind E, Poorkaj P, Schellenberg G, Tanzi R, Wasco W, Lannfelt L, Selkoe D, Younkin S. 1996. Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nat Med*. 2, 864-70.

Schrijver NC, Bahr NI, Weiss IC, Würbel H. 2002. Dissociable effects of isolation rearing and environmental enrichment on exploration, spatial learning and HPA activity in adult rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 73, 209-24.

Shimabukuro J, Awata S, Matsuoka H. 2005. Behavioral and psychological symptoms of dementia characteristic of mild Alzheimer patients. *Psychiatry Clin. Neurosci*. 59, 274-9.

Shin IS, Carter M, Masterman D, Fairbanks L, Cummings JL. 2005. Neuropsychiatric symptoms and quality of life in Alzheimer disease. *Am. J. Geriatr. Psychiatry* 13, 469-74.

Spalletta G, Baldinetti F, Buccione I, Fadda L, Perri R, Scalmana S, Serra L, Caltagirone C. 2004. Cognition and behaviour are independent and heterogeneous dimensions in Alzheimer's disease. *J. Neurol*. 251, 688-95.

Stern Y. 2009. Cognitive reserve. *Neuropsychologia*. 47, 2015-28.

Sterniczuk R, Antle MC, Laferla FM, Dyck RH. 2010. Characterization of the 3xTg-AD mouse model of Alzheimer's disease: part 2. Behavioral and cognitive changes. *Brain Res.* 1348, 149-55.

Stewart K, Bayne K. 2004. Environmental enrichment for laboratory animals. In: Reuter JD, editor. *Laboratory animal medicine and management*. New York: International veterinary information service; 2004.

Swain RA, Harris AB, Wiener EC, Dutka MV, Morris HD, Theien BE, Konda S, Engberg K, Lauterbur PC, Greenough WT. 2003. Prolonged exercise induces angiogenesis and increases cerebral blood volume in primary motor cortex of the rat. *Neuroscience.* 117, 1037-46.

Tan LL, Wong HB, Allen H. 2005. The impact of neuropsychiatric symptoms of dementia on distress in family and professional caregivers in Singapore. *Int. Psychoger.* 17, 253-63.

Tang YP, Wang H, Feng R, Kyin M, Tsien JZ. 2001. Differential effects of enrichment on learning and memory function in NR2B transgenic mice. *Neuropharmacology.* 41, 779-90.

Tanzi RE, Bertram L. 2001. New frontiers in Alzheimer's disease genetics. *Neuron.* 32, 181-4.

Tobeña A, Fernández-Teruel A. 2010. Modelos animales en psiquiatría. En: Vallejo Ruiloba J, Leal Cercós C (Eds) *Tratado de psiquiatría*. Vol 1. 2ª edición. Barcelona: Ars Mèdica, pp. 414-426.

Tong L, Shen H, Perreau VM, Balazs R, Cotman CW. 2001. Effects of exercise on gene-expression profile in the rat hippocampus. *Neurobiol Dis.* 8, 1046-56.

Torasdotter M, Metsis M, Henriksson BG, Winblad B, Mohammed AH. 1998. Environmental enrichment results in higher levels of nerve growth factor mRNA in the rat visual cortex and hippocampus. *Behav Brain Res.* 93, 83-90.

Touma C, Ambrée O, Görtz N, Keyvani K, Lewejohann L, Palme R, Paulus W, Schwarze-Eicker K, Sachser N. 2004. Age- and sex-dependent development of adrenocortical hyperactivity in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 25, 893-904.

Tremml P, Lipp HP, Müller U, Wolfer DP. 2002. Enriched early experiences of mice underexpressing the beta-amyloid precursor protein restore spatial learning capabilities but not normal openfield behavior of adult animals. *Genes Brain Behav.* 1, 230-41.

Tseng BP, Kitazawa M, LaFerla FM. 2004. Amyloid B-peptide: The Inside Story. *Curr. Alzh. Res.* 1, 231-39.

Tulving E. 1983. *Elements of episodic memory.* Oxford: Clarendon Press.

Turner PR, O'Connor K, Tate WP, Abraham WC. 2003. Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory. *Prog Neurobiol.* 70, 1-32.

Um HS, Kang EB, Koo JH, Kim HT, Jin-Lee, Kim EJ, Yang CH, An GY, Cho IH, Cho JY. 2011 Treadmill exercise represses neuronal cell death in an aged transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurosci Res.* 69, 161-73.

Unverzagt FW, Kasten L, Johnson KE, Rebok GW, Marsiske M, Koepke KM, Elias JW, Morris JN, Willis SL, Ball K, Rexroth DF, Smith DM, Wolinsky FD, Tennstedt SL. 2007. Effect of memory impairment on training outcomes in ACTIVE. *J Int Neuropsychol Soc.* 13, 953-60.

Valenzuela MJ, Sachdev P. 2006. Brain reserve and dementia: a systematic review. *Psychol Med.* 36, 441-54.

Van Dam D, D'Hooge R, Staufenbiel M, Van Ginneken C, Van Meir F, De Deyn PP. 2003. Age-dependent cognitive decline in the APP23 model precedes amyloid deposition. *Eur J Neurosci.* 17, 388-96.

van Praag H, Kempermann G, Gage FH. 1999. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat Neurosci.* 2, 266-70.

van Praag H, Christie BR, Sejnowski TJ, Gage FH. 1999b. Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96, 13427-31.

Van Praag H, Kempermann G, Gage FH. 2000. Neural consequences of environmental enrichment. *Nat. Rev. Neurosci.* 1, 191-8.

van Praag H. 2008. Neurogenesis and exercise: past and future directions. *Neuromolecular Med.* 10, 128-40.

Viña J, Lloret A. 2010. Why women have more Alzheimer's disease than men: gender and mitochondrial toxicity of amyloid-beta peptide. *J Alzheimers Dis.* 2, S527-33.

Vokó Z, Hollander M, Hofman A, Koudstaal PJ, Breteler MM. 2003. Dietary antioxidants and the risk of ischemic stroke: the Rotterdam Study. *Neurology.* 61, 1273-5.

Volkmar FR, Greenough WT. 1972. Rearing complexity affects branching of dendrites in the visual cortex of the rat. *Science.* 176, 1445-7.

Wallace CS, Kilman VL, Withers GS, Greenough WT. 1992. Increases in dendritic length in occipital cortex after 4 days of differential housing in weanling rats. *Behav Neural Biol.* 58, 64-8.

Wallin AK, Blennow K, Andreasen N, Minthon L. 2006. CSF biomarkers for Alzheimer's Disease: levels of beta-amyloid, tau, phosphorylated tau relate to clinical symptoms and survival. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 21, 131-8.

Walsh RN, Budtz-Olsen OE, Penny JE, Cummins RA. 1969. The effects of environmental complexity on the histology of the rat hippocampus. *J Comp Neurol.* 137, 361-6.

Walsh RN, Cummins RA. 1976. The Open-Field Test: a critical review. *Psychol Bull.* 83, 482-504.

Wang D, Yang L, Su J, Niu Y, Lei X, Xiong J, Cao X, Hu Y, Mei B, Hu JF. 2011. Attenuation of neurodegenerative phenotypes in Alzheimer-like presenilin 1/presenilin 2 conditional double knockout mice by EUK1001, a promising derivative of xanomeline. *Biochem Biophys Res Commun.* 410, 229-34.

Wang PS, Schneeweiss S, Avorn J, Fischer MA, Mogun H, Solomon DH, Brookhart MA. 2005. Risk of death in elderly users of conventional vs. atypical antipsychotic medications. *N Engl J Med.* 353, 2335-41.

Waring SC, Rosenberg RN. 2008. Genome-wide association studies in Alzheimer disease. *Arch Neurol.* 65, 329-34.

Wesson DW, Levy E, Nixon RA, Wilson DA. 2010. Olfactory dysfunction correlates with amyloid-beta burden in an Alzheimer's disease mouse model. *J Neurosci.* 30, 505-14.

West MJ, Coleman PD, Flood DG, Troncoso JC. 1994. Differences in the pattern of hippocampal neuronal loss in normal ageing and Alzheimer's disease. *Lancet*. 344, 769-72.

Weyer SW, Klevanski M, Delekate A, Voikar V, Aydin D, Hick M, Filippov M, Drost N, Schaller KL, Saar M, Vogt MA, Gass P, Samanta A, Jäschke A, Korte M, Wolfer DP, Caldwell JH, Müller UC. 2011. APP and APLP2 are essential at PNS and CNS synapses for transmission, spatial learning and LTP. *EMBO J*. 30, 2266-80.

Whishaw IQ, Mittleman G. 1986. Visits to starts, routes, and places by rats (*Rattus norvegicus*) in swimming pool navigation tasks. *J Comp Psychol*. 100, 422-31.

Whishaw IQ. 1995. A comparison of rats and mice in a swimming pool place task and matching to place task: some surprising differences. *Physiol Behav*. 58, 687-93.

Whishaw IQ. 1985. Formation of a place learning-set by the rat: a new paradigm for neurobehavioral studies. *Physiol Behav*. 35, 139-43.

Whitehouse PJ, Price DL, Struble RG, Clark AW, Coyle JT, Delon MR. 1982. Alzheimer's disease and senile dementia: loss of neurons in the basal forebrain. *Science*. 215, 1237-9.

Widman DR, Rosellini RA. 1990. Restricted daily exposure to environmental enrichment increases the diversity of exploration. *Physiol Behav*. 47, 57-62.

Will B, Galani R, Kelche C, Rosenzweig MR. 2004. Recovery from brain injury in animals: relative efficacy of environmental enrichment, physical exercise or formal training (1990-2002). *Prog Neurobiol*. 72, 167-82.

Williams CL, Barnett AM, Meck WH. 1990. Organizational effects of early gonadal secretions on sexual differentiation in spatial memory. *Behav Neurosci.* 104, 84-97.

Wirhth O, Bayer TA. 2010. Neuron loss in transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *Int J Alzheimers Dis.* pii: 723782.

Wolf SA, Kronenberg G, Lehmann K, Blankenship A, Overall R, Staufenbiel M, Kempermann G. 2006. Cognitive and physical activity differently modulate disease progression in the amyloid precursor protein (APP)-23 model of Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry.* 60, 1314-23.

Wolfer DP, Stagljar-Bozicevic M, Errington ML, Lipp HP. 1998. Spatial Memory and Learning in Transgenic Mice: Fact or Artifact? *News Physiol Sci.* 13, 118-123.

Wolozin B, Kellman W, Rousseau P, Celesia GG, Siegel G. 2000. Decreased prevalence of Alzheimer disease associated with 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Arch Neurol* 57, 1439-43.

Xie H, Litersky JM, Hartigan JA, Jope RS, Johnson GV. 1998. The interrelationship between selective tau phosphorylation and microtubule association. *Brain Res.* 798, 173-83.

Yehuda S, Rabinovitz S, Carasso RL, Mostofsky DI. 2002. The role of polyunsaturated fatty acids in restoring the aging neuronal membrane. *Neurobiol Aging.* 23, 843-53.

Young D, Lawlor PA, Leone P, Dragunow M, During MJ. 1999. Environmental enrichment inhibits spontaneous apoptosis, prevents seizures and is neuroprotective. *Nat Med* 5, 448-53.

Yuk DY, Lee YK, Nam SY, Yun YW, Hwang DY, Choi DY, Oh KW, Hong JT. 2009. Reduced anxiety in the mice expressing mutant (N141I) presenilin 2. *J Neurosci Res.* 87, 522-31.

Zambrana C, Marco EM, Arranz L, de Castro NM, Viveros MP, de la Fuente M. 2007. Influence of aging and enriched environment on motor activity and emotional responses in mice. *Ann N Y Acad Sci.* 1100, 543-52.

Zhang Y, McLaughlin R, Goodyer C, LeBlanc A. 2002. Selective cytotoxicity of intracellular amyloid beta peptide1-42 through p53 and Bax in cultured primary human neurons. *J. Cell. Biol.* 156, 519-29.

Zhu SW, Yee BK, Nyffeler M, Winblad B, Feldon J, Mohammed AH. 2006. Influence of differential housing on emotional behaviour and neurotrophin levels in mice. *Behav Brain Res.* 169, 10-20.

Zimmermann A, Stauffacher M, Langhans W, Würbel H. 2001. Enrichment-dependent differences in novelty exploration in rats can be explained by habituation. *Behav Brain Res.* 121, 11-20.

Ziv Y, Ron N, Butovsky O, Landa G, Sudai E, Greenberg N, Cohen H, Kipnis J, Schwartz M. 2006. Immune cells contribute to the maintenance of neurogenesis and spatial learning abilities in adulthood. *Nat Neurosci.* 9, 268-75.

Anexo

Review

Modeling behavioral and neuronal symptoms of Alzheimer's disease in mice: A role for intraneuronal amyloid

L. Giménez-Llort^{a,*}, G. Blázquez^a, T. Cañete^a, B. Johansson^{b,c}, S. Oddo^d, A. Tobeña^a,
F.M. LaFerla^d, A. Fernández-Teruel^a

^aMedical Psychology Unit, Department of Psychiatry and Forensic Medicine, School of Medicine, Institute of Neuroscience, Autonomous University of Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain

^bDepartment of Neuroscience, Karolinska Institutet, KS CMM L8:01, SE-171 76 Stockholm, USA

^cDepartment of Clinical Neuroscience, Karolinska Institutet, KS CMM L8:01, SE-171 76 Stockholm, Sweden

^dDepartment of Neurobiology and Behavior, University of California, Irvine, CA 92697-4545, USA

Abstract

The amyloid A β -peptide (A β) is suspected to play a critical role in the cascade leading to AD as the pathogen that causes neuronal and synaptic dysfunction and, eventually, cell death. Therefore, it has been the subject of a huge number of clinical and basic research studies on this disease. A β is typically found aggregated in extracellular amyloid plaques that occur in specific brain regions enriched in nAChRs in Alzheimer's disease (AD) and Down syndrome (DS) brains. Advances in the genetics of its familiar and sporadic forms, together with those in gene transfer technology, have provided valuable animal models that complement the traditional cholinergic approaches, although modeling the neuronal and behavioral deficits of AD in these models has been challenging. More recently, emerging evidence indicates that intraneuronal accumulation of A β may also contribute to the cascade of neurodegenerative events and strongly suggest that it is an early, pathological biomarker for the onset of AD and associated cognitive and other behavioral deficits. The present review covers these studies in humans, in in vitro and in transgenic models, also providing more evidence that adult 3 \times Tg-AD mice harboring *PS1*_{M146V}, *APP*_{Swe}, *tau*_{P301L} transgenes, and mimicking many critical hallmarks of AD, show cognitive deficits and other behavioral alterations at ages when overt neuropathology is not yet observed, but when intraneuronal A β , synaptic and cholinergic deficits can already be described.

© 2006 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Intraneuronal amyloid; Animal models; 3xTgAD mice; Learning and memory; Neuropsychiatric-like symptoms; Activity; Circadian rhythms; Emotion; Psychosis

Contents

1. Introduction	126
2. Molecular aspects of intraneuronal amyloid accumulation.	126
3. Modeling the cognitive symptoms of AD in rodents	127
3.1. Earlier, cholinergic studies	128
3.2. Animal models for AD using gene transfer strategies	128
3.3. Searching for neuronal correlates of early cognitive deficits of AD	129
3.4. Studying the consequences of A β and nAChRs interactions	130
3.5. The relevance of longitudinal studies	130
4. Modeling the neuropsychiatric symptoms of dementia	131

*Corresponding author. Tel.: +34 93 581 2378; fax: +34 93 581 1435.

E-mail address: lidia.gimenez@uab.cat (L. Giménez-Llort).

4.1. Activity disturbances and circadian rhythms	132
4.2. Emotional and psychotic symptoms	136
5. Concluding remarks	143
Acknowledgments	143
References	143

1. Introduction

The neurobiology of aging has been one of the most rapidly expanding areas of scientific endeavor over the past two decades. Special efforts have been focused on understanding the neuronal mechanisms underlying age-related neurodegenerative disorders, whose prevalence in the elderly is dramatically increasing in parallel to that of life expectancy and social aging. This is the case for Alzheimer's disease (AD), the most common neurodegenerative disorder and cause of senile dementia, and the target of a large and important body of clinical and basic research. Advances in transgenic technology, as well as in the genetics of the early-onset familial form and the genetic risk factors involved in sporadic cases (see Selkoe, 2001) have been critical for establishing animal models that reproduce the main pathological hallmarks of AD: extracellular beta-amyloid (A β) plaques and neurofibrillary tangles (NFTs). However clinical symptoms in humans, which include memory loss and impairments of other cognitive abilities interfering with mood, reason, judgment and language have not always found their parallel in animal models for this disease. Extensive reviews have been devoted to summarizing what is known about brain aging and neurodegeneration, as well as the contribution of evolving animal models for AD (e.g. Selkoe, 1989; Theuring et al., 1997; Jucker and Ingram, 1997; McDonald and Overmier, 1998; Janus and Westaway, 2001; Ashe, 2001; Hock and Lamb, 2001; Auld et al., 2002; Hardy and Selkoe, 2002). They not only show how challenging it has been to model behavioral and neuronal symptoms of this progressive, neurodegenerative disease in rodents, but also announce that, finally, newly engineered models are providing valuable clues to understanding the causal factors and pathological mechanisms of this disease. These models are also critical for assessing new preventive or therapeutic approaches prior to the initiation of human clinical trials. The present work is aimed at reviewing these efforts, while focusing on recent and earlier results pointing to a pathogenic role for intracellular A β that strongly implicate it in the onset of the cognitive dysfunction encountered with AD.

2. Molecular aspects of intraneuronal amyloid accumulation

Protein misfolding and aggregation is a common feature of proteinopathies such as inclusion body myositis (IBM), prion diseases and several neurodegenerative disorders such as AD, Down syndrome (DS), Parkinson's disease (PD), Huntington disease (HD), frontotemporal

dementia with parkinsonism linked to chromosome 17 (FTDP17) or amyotrophic lateral sclerosis (ALS). It has been well established that aberrant accumulation of these protein aggregates may occur intracellularly (i.e., in HD and PD), extracellularly (i.e., prion disorders) or both, as happens in AD where intracellular inclusions of NFTs and Lewy bodies, but also extracellular deposits of amyloid plaques, are observed (for review see Tseng et al., 2004).

In the pathologic events leading to AD, DS and IBM, the amyloid β -peptide (A β) plays an early and critical role. The amyloid cascade hypothesis for AD and DS has been traditionally focused on aggregated, extracellular A β or amyloid plaques serving as the pathogenic species that causes neuronal and synaptic dysfunction, and eventually cell death (Selkoe, 1989, 2000). Gradual aberrant accumulation of A β initiates a complex, multistep cascade that includes gliosis, inflammatory changes, neuritic/synapse change, tangles and transmitter loss. On the other hand, intracellular aggregation of this peptide is well recognized as an early and integral component of the pathogenesis of the human muscle disorder IBM (Mendell et al., 1991; Askanas et al., 1993). More recently, a large number of studies using cell culture systems, transgenic mouse models and human AD and DS brain samples have additionally provided compelling evidence of intraneuronal accumulation of the oligomeric non-fibrillar A β 1-42 form of this peptide preceding the overt neuropathological hallmarks, and have indicated that it may also contribute to the cascade of neurodegenerative events that occur in these diseases (also reviewed in Tseng et al., 2004). For instance, in certain AD brain neurons, intraneuronal A β 1-42 peptides appear to be co-localized with paired helical filaments (PHF) characteristic of tangle pathology (Grundke-Iqbal et al., 1989; Perry et al., 1992; Murphy et al., 1994), the presence of intracellular A β 1-42 correlates with the intracellular accumulation of apolipoprotein E and is frequently associated with DNA nuclear fragmentation (LaFerla et al., 1997) and cell lysis (D'Andrea et al., 2001). These post-mortem observations are also supported by a variety of experimental paradigms ranging from transgenic expression of intracellular A β 1-42 (LaFerla et al., 1995) and inducible expression in neuronal cultures (Magrane et al., 2004) to direct microinjection of peptide into primary neurons (Zhang et al., 2002), indicating that intraneuronal A β can lead to cytotoxicity via a p53-dependent mechanism (LaFerla et al., 1996, 1997; Zhang et al., 2002). Intracellular A β 42 immunostaining preceding development of the extracellular pathology has been also described as an early event in DS (Gyure et al., 2001; Mori et al., 2002) and in some transgenic models for AD (Chui

et al., 1999; Wirths et al., 2001; Shie et al., 2003; Oddo et al., 2003a, b). Besides, non-fibrillar A β proteins have also been found within both neurons and non-neuronal cells, prior to amyloid plaques, in aged monkeys and dogs naturally developing age-related A β neuropathology and learning and memory deficits (Martin et al., 1994; Cummings et al., 1993). A β is synaptotoxic even in the absence of plaques and high levels of A β 1-42 are insufficient to induce plaque formation in mice expressing wild-type human APP, supporting the emerging view that plaque-independent A β toxicity plays an important role in the development of synaptic deficits in AD and related conditions (Mucke et al., 2000). In accordance with these new insights, the amyloid cascade hypothesis also considers a pathogenic role for A β (see Oddo et al., 2003a, b; Tseng et al., 2004; LaFerla and Oddo, 2005), to where intracellular accumulation of A β would alter the cellular phenotype and contribute to neuronal dysfunction and neurodegeneration. This most likely happens by interference with organelle function and by the modification of calcium regulation and intracellular signaling mechanisms. Intracellular A β may also promote tau hyperphosphorylation, either by increasing kinase activity or decreasing phosphatase activity, and induce cell death. Early post-synaptic dysfunction has also been linked to the intraneuronal occurrence of A β , as in transgenic rodents and human AD brains its accumulation in multivesicular bodies within presynaptic and especially postsynaptic compartments is

associated with abnormal synaptic morphology months before A β pathology occurs (Takahashi et al., 2002). Besides, hippocampal synaptic function is compromised (LTP deficits) at early ages in triple transgenic 3 \times Tg-AD mice (*APP*_{Swe}, *PS1*_{M146V}, *tau*_{P301L}) when only intracellular A β immunoreactivity is detected (see Section 3.3 and also legend Table 1). Therefore, all of this evidence supports the idea of an early pathological role for intracellular A β in AD. In the following paragraphs, we will see that it may be also the molecular trigger of the cognitive decline in AD, as well. The key questions that remains to be answered is whether intracellular A β serves as a source for extracellular A β that exists in the diffuse and neuritic plaque, and which are the mechanisms that lead to the cognitive and other behavioral deficits observed in AD.

3. Modeling the cognitive symptoms of AD in rodents

Assessing the entire range of selective cognitive and behavioral characteristics of dementia in detail is extremely important, since the clinical expressions of cognition and behavior in AD patients are heterogeneous. Different kinds of symptoms can also be improved by the same pharmacological therapy, which has enabled the grouping of symptoms into a more manageable number of syndromes, thereby assisting in the evaluation of patients' behavior. Also, some studies have approached the connections among selective cognitive domains and other behavioral

Table 1
Summary of new experiments and results in adult and old 3 \times TgAD mice

Experiment, tables, figures	Age (months)	NTg (n)	3 \times TgAD (n)	Somatic growth	MWM	BPSD	SM function	Spontaneous activity	Circadian activity
1, Table 2, Fig. 5A	2.5	10	9	Normal	—	—	Normal	↓ Rearings	Normal
1, Table 2, Fig. 5B	6	10	9	↑	—	—	Normal	↑ Locomotion	(N/D ratio)
2, Table 4, Figs. 1 and 7	2.5	13	13	↑	Normal	↑ Emotionality ↓rearrings OF	—	—	—
2, Table 4, Figs. 2 and 8	6	13	13	↑	Deficits	↑ Emotionality ↓OF ↑WB	—	—	—
3, Table 3, Figs 3, 4, 6 and 9	12	10	12	↑	Deficits	↓CI, OF, DLB and BHB ↑ Emotionality	Changes	↓ Initial activity ↑ 1 h locomotion	—

3 \times TgAD mice harboring *PS1*/M146V, *APP*_{Swe} and *tau*_{P301L} transgenes were genetically engineered at the University of California Irvine as previously described (Oddo et al., 2003a). This model progressively develops β A plaques and neurofibrillary tangles with a temporal- and regional-specific profile that closely mimics their development in the human AD brain. Synaptic dysfunction is manifested in an age-dependent manner, but before plaque and tangle pathology. β A deposits start in the cortex and progress to the hippocampus with aging, whereas tau pathology is first apparent in the hippocampus and progresses to the cortex (Oddo et al., 2003b). A colony of homozygous 3 \times TgAD mice and wild-type non-transgenic (NTg) littermates was created at the Medical Psychology Unit, Autonomous University of Barcelona in July 2004, where animals were bred, maintained until aged and behaviorally evaluated. Genotypes were confirmed by PCR after tail biopsies, at the Karolinska Institute. Two or three animals of the same genotype were maintained (Macrolon cages, 35 \times 35 \times 25 cm) under standard laboratory conditions (food and water ad lib, 22 \pm 2 $^{\circ}$ C, 12 h light:dark starting at 08:00 h). The first and second generations were behaviorally evaluated in a series of tests used as a screening for behavioral abnormalities in mutant mice (**Giménez-Llort et al., 2002): Morris water maze (MWM), behavioral and psychological symptoms of dementia-like behaviors (BPSD): corner index measure (CI), open-field (OF), plus maze (PM), white-black box (WBB) or dark-light box (DLB), Boissier's 16-hole board (BHB), sensorimotor tasks (SMT) and spontaneous activity (5 min, 1 h or 24 h, N/D ratio: nocturnal/diurnal activities ratio). For details see the following Tables and Figures. The ages of the animals were chosen according to neuropathological stages described by Oddo et al. (2003a, b). Namely, 2 months of age for absence of A β intra- and extracellular immunoreactivity (IR), 6 months for presence of intraneuronal A β IR and hippocampal synaptic deficits on LTP and 12 months for β A deposits and early stages of tau pathology (mislocation). Experiments were conducted between 10:00 and 13:00 h under dim white light (20 lux) except for circadian activity which was scored during one whole light-dark (LD) period. In all experiments animals were counterbalanced per genotype (and age). The research was performed in accordance with 86/609/EEC regarding the care and use of animals for experimental procedures. Animals were weighed before each test. Symbols in the table: \uparrow : increases; \downarrow : decreases.

symptoms by means of factorial analyses (e.g. Spalletta et al., 2004; Mirakhur et al., 2004). Spalletta et al. (2004) reported that a principal component analysis condensed cognitive/behavioral variables into seven factors, namely: general-cognitive, constructional abilities, hyperactivity, psychosis, anxiety, mood-excitement and mood-depression/apathy, concluding that cognition and other behavioral aspects are independent dimensions. Due to this complexity and heterogeneity in the human manifestation of AD neuropathology, it would appear that modeling cognitive and behavioral deficits in animal models must be difficult to achieve. In parallel to the clinical approach, recent multimetric statistical analyses of behavioral measures from AD transgenic mice have revealed their usefulness in characterizing and discriminating between performances of different AD transgenic mouse lines differing in A β deposition, thus underscoring the association between cognitive impairment and A β neuropathology (Leighty et al., 2004). Those researchers have also used such an analysis to demonstrate that behavioral comparisons of different APP^{sw} and TauP301L murine models provide evidence of linkage of poorer cognitive performance to tau pathology in the forebrain (Arendash et al., 2004). Therefore, in both clinical and basic research such analyses seem to be an important tool for characterizing and understanding both the neurobiological basis of the disease heterogeneity and the functional evaluation of therapeutic interventions, as well as helping to find behavioral measures that can serve as predictors of pathology.

3.1. Earlier, cholinergic studies

Initial attempts to model cognitive impairment in rodents were based on the “cholinergic hypothesis of geriatric and AD memory dysfunction” (Bartus et al., 1982, see also Terry and Buccafusco, 2003) and made use of cognitive assessment tasks derived from classical studies on learning and memory. The neurodegeneration of the basal forebrain cholinergic system observed in end-stage AD brains was induced through excitotoxic or immunotoxic lesions of cholinergic neurons at the nucleus of Meinert (NBM), the diagonal bands of Broca and the medial septal nucleus (MS), which innervate limbic and cortical brain structures. There were also attempts to mirror the cognitive anomalies of cholinergic dysfunction by using antimuscarinic agents (for reviews see Bartus, 2000; Auld et al., 2002), which also produced inconsistent results. According to a critical review (McDonald and Overmier, 1998), “lesions in the MS produce behavioral deficits that are most similar to the mnemonic impairments in the earliest stage of AD, although the parallel is not definitive and more work is needed to clarify the relationship between neurobiology and behavior in AD”. Those authors suggested that “modeling of the mnemonic deficits in AD should be limited to the amnesia observed early in the course of the disease, to eliminate the influence of

impairments in non-mnemonic processes”. For instance, lesions restricted to NBM rather modeled the attentional dysfunction often observed at the later stages of the disease, than deficits in learning and memory per se (see Robbins, 2000; Robbins et al., 1989). They also stressed the necessity to “choose behavioral tasks for their specificity and selectivity to the behavioral phenomena observed in early-stage AD” and claimed that “tasks that manipulate the delay between learning and remembering are better able to differentiate Alzheimer patients from persons with other disorders, and better able to differentiate effects of manipulation in animals”. These had also been controversial points, as functional blockade of the cholinergic system with competitive acetylcholine antagonists seemed to depend on the behavioral test used and the animal’s degree of training (see the review by Auld et al., 2002). Damage limited to basal forebrain cholinergic neurons may be necessary, but not enough, to produce the severe mnemonic deficits of AD. Destruction of other (limbic and cortical) cholinergic brain systems, the dysfunction of noradrenergic/serotonergic neurotransmitter systems, or pathological abnormalities in cortical and limbic structures would therefore be required to disrupt memory in AD (Auld et al., 2002).

3.2. Animal models for AD using gene transfer strategies

Advances in gene transfer techniques have made it possible to study the effects of overexpression of mutant human amyloid precursor protein (APP) and presenilin-1 (PS1) or presenilin-2 (PS2) genes in rodents, as several mutations in these genes have been identified which can cause autosomal, dominant familial AD (FAD) (for a review see Mattson, 2004). In fact, the first attempts to produce AD-like pathology in transgenic mice were founded on premature aging with AD-like pathology, as developed by DS patients, suggesting a role for overexpression of chromosome 21-encoded APP (Lai and Williams, 1989). Several transgenic animal models of AD based on expression of mutant FAD transgenes have been developed so far (for recent reviews see Masliah and Rockenstein, 2000; Ashe, 2001; Hock and Lamb, 2001; Janus and Westaway, 2001; Auld et al., 2002; Higgins and Jacobsen, 2003). One of the most recent strategies has led to 3 \times Tg-AD, a triple-transgenic mouse harboring *PS1^{M146V}*, *APP^{Swe}* and *tau^{P301L}* transgenes, which mimics both amyloid and tau AD-neuropathologies and presents synaptic and cholinergic deficits (Oddo et al., 2003a,b, 2005), as well as associated impairment of cognition and other behaviors (Billings et al., 2005; and results to be presented here). However, modeling behavioral symptoms of AD in these transgenic animals has been challenging, as many laboratories have failed to reproduce the brain and/or behavioral abnormalities. In this regard, original research and recent guidelines on the validation of animal models for AD (see Janus et al., 2000; Janus and Westaway, 2001) stress the importance of the background

of the host transgenic line as it may interfere with, or even determine the behavioral variables to be studied. For instance, visual and learning impairments in the FVB/N genetic background made it difficult to demonstrate cognitive deficits in its derived transgenic lines unless they were crossed with C57BL/6 mice (Hsiao et al., 1996; Chapman et al., 1999). The relevance of suitable background was also observed in double transgenics expressing both APP and PS1 mutations and developing extensive amyloid deposits. In this case, behavioral changes were not associated with amyloid deposits, as animals showed normal spatial navigation abilities at up to 9 months of age when the transgene was expressed on a mixed genetic background (Holcomb et al., 1999). The fore-mentioned guidelines also highlight the need to use non-transgenic littermates to control for the non-specific effect of genetic manipulation. For instance, normal FVB/N mice showed the same phenotypic features as FVB/N-TgN(PrP-APP695) mice, that is an acceleration of natural occurring age-related CNS disorders (Hsiao et al., 1995). Thereafter, continuous efforts generating double and triple mutants were necessary to make the transgenic animal's phenotype more closely resemble that seen in humans. Finally, as extensively recorded in several of the above-mentioned reviews, deficits in spatial (several kind of mazes) and non-spatial (OR) learning and memory tasks in such unconditioned paradigms, but also conditioned paradigms (such as passive and shock avoidance, and delayed conditional discrimination tasks) have been demonstrated in these models, although conflicting results are still to be found in the literature.

3.3. Searching for neuronal correlates of early cognitive deficits of AD

Mild cognitive impairment (MCI) has emerged as an identifiable condition, and in many cases is a transitional state preceding diagnosable AD (Hwang et al., 2004). The biological and clinical relevance of this early stage is irrefutable and, therefore, identifying the biological markers that trigger the onset of AD-related cognitive deficit is a key question to be addressed at both the clinical and preclinical research levels. How are the hallmark features of AD: neuropathology, plaques and tangles, related to cognitive impairments? In sporadic AD, the number of amyloid plaques and levels of secreted A β do not correlate well with synaptic loss and the clinical manifestation of the disease (Arriagada et al., 1992; Samuel et al., 1994). The number of tangles seems to be a more predictive measure of overall cognitive dysfunction in humans with a clinical AD diagnosis (McKee et al., 1991; Arriagada et al., 1992) but it does not represent a reliable biomarker for the onset of early cognitive anomalies. Loss of neuronal synaptic density and synapse number is another invariant feature of the disease that appears to precede overt neuronal degeneration (DeKosky and Scheff, 1990; Scheff et al., 1991). In fact, the major correlate of cognitive impairment

is synaptic loss (Terry et al., 1991; Roses, 1994), and synaptic dysfunction stands as the most significant factor contributing to the initial stages of memory loss in AD (Flood and Coleman, 1990; Dickson et al., 1995; Sze et al., 1997; Masliah et al., 2001), although the trigger underlying the synaptic pathology is unknown. Recent advances in PET and SPECT functional neuroimaging are providing new insights into the temporal course of neurodegeneration and have shown that structural hippocampal and amygdalar atrophy and first clinical manifestations are preceded by temporal and parietal hypoperfusion and hypometabolism (for a review see Mosconi, 2005). However, specific markers for neurotransmitter dysfunction preceding these metabolic changes remain to be found.

Synaptic loss is a phenotype scarcely reproduced in transgenic models for AD (but see Chen et al., 1998; Masliah and Rockenstein, 2000; Oddo et al., 2003a,b) although massive neuronal death with topographic distribution similar to that in AD has been recently reproduced in APP^{SL}PS1KI mice independently of the presence of extracellular deposits of A β (Casas et al., 2004). The relationship between cognitive deficits and A β has also been controversial in transgenic mice as there are inconsistencies between cognitive phenotyping and the onset of the neuropathology. Thus, cognitive impairments were observed either to appear long before plaque formation and correlating with reduced LTP (i.e. TgAPP/Ld/2 and TgAPP/Wt/4 mice, Moechars et al., 1999), or not to be related to A β deposition but rather to hippocampal atrophy (i.e. TgPDAPP, Dodart et al., 2000, 2002). Also, expression of wild-type human APP transgene, even in the absence of any detectable amyloid deposits, is sufficient to cause memory impairment similar to that produced by expression of the mutant FAD genes (Moechars et al., 1999). In a similar way, aged mice with FAD PS-1 mutation involved in amyloidogenesis and facilitation of apoptotic neuronal death in vitro, show significantly accelerated neurodegeneration in absence of amyloid plaques while showing intracellularly deposited A β 42 (Chui et al., 1999). Some authors have subsequently described correlations between the age-related increase of A β plaque deposition with certain learning deficits (i.e. Chen et al., 2000) and it has also been shown that performance of transgenic mouse lines differing in level of expression of the transgene and in A β deposition can be differentiated with multimetric statistical analyses, underscoring the association between cognitive impairment and A β neuropathology (Leighty et al., 2004). Progressive cognitive impairment and anxiety induction in the absence of visible plaque deposition in C57BL/6 inbred mice expressing transgenic APP has also been demonstrated (Lee et al., 2004).

We can therefore conclude that in some of these transgenic models that overexpress different mutations of APP or wild-type human APP in the brain, early phenotypic changes in cognition emerge prior to any overt neuropathology and correlate poorly with plaque number,

giving support to the role of the intraneuronal presence of this peptide in the amyloid hypothesis. In $3 \times$ Tg-AD mice harboring *PSI*_{M146V}, *APP*_{Swe} and *tau*_{P301L} transgenes (Oddo et al., 2003a, b), the molecular trigger for the onset of their cognitive decline has been recently defined (Billings et al., 2005). This triple-transgenic model of AD mimics many critical hallmarks of AD neuropathology. Consistent with the amyloid cascade hypothesis, extracellular amyloid $A\beta_{42}$ plaques precede NFTs, and both develop in an hierarchic and sequential manner in AD-relevant brain regions (cortex, hippocampus and amygdala) in parallel to the human AD brain (Oddo et al., 2003a, b, 2005). Brain inflammation also develops in an age-related fashion and microglia co-localize with fibrillar $A\beta$ plaques (Kitazawa et al., 2005). The question is that dysfunction in synaptic plasticity, including deficits in LTP and paired-pulse facilitation, occurs prior to extracellular $A\beta$ deposition and tangles, and is associated with an early intraneuronal $A\beta$ immunoreactivity (Oddo et al., 2003a, b). This suggests a new pathophysiological role for intraneuronal $A\beta$ and indicates, as well, that synaptic dysfunction is a proximal defect in the pathobiology of AD, preceding extracellular plaque formation and tangles. In addition, these animals also show a selective and age-dependent loss of $\alpha 7$ nAChRs in the hippocampus and cortex, a reduction that correlates with the buildup of intraneuronal $A\beta$ as it appears at 6 months of age and is restricted to brain regions that show intraneuronal $A\beta_{42}$ accumulation (Oddo et al., 2005).

As mentioned earlier, evidence of intraneuronal $A\beta$ accumulation as an early event in humans with AD and as a potential biomarker for the onset of dementia symptoms in AD has also recently been obtained (for review see Tseng et al., 2004): that being in vitro neurotoxicity of micro-injected $A\beta_{42}$ isoform (Zhang et al., 2002), as well as $A\beta_{42}$ immunoreactivity within neurons that were either close to or within extracellular plaques (Mochizuki et al., 2000) and also within hippocampal pyramidal neurons of individuals with clinical diagnoses ranging from MCI to severe cognitive impairments (Gouras et al., 2000). In a similar way, intraneuronal $A\beta$ -amyloid accumulation is described in DS brain (Mori et al., 2002), also preceding development of amyloid plaques (Gyure et al., 2001).

3.4. Studying the consequences of $A\beta$ and nAChRs interactions

Cell loss and selective vulnerability of basal forebrain cholinergic system neurons is one of the most prominent neuropathological correlates of dementia severity in AD (Bierer et al., 1995). In *postmortem* frontal cortex from AD patients, acetylcholine (ACh) levels, cholinacetyltransferase (ChAT) and acetylcholinesterase (AChE) activity are all reduced compared to controls, and both ChAT and AChE activity show a significant correlation with cognitive deficits (i.e. Gil-Bea et al., 2005). Also, loss of nAChRs is a well-established feature of AD (Sugaya et al., 1990; Whitehouse et al., 1986; Nordberg and Winblad, 1986;

Nordberg et al., 1992), and regional susceptibility to AD neuropathology (hippocampus and cortex) coincide with the presence of higher $\alpha 7$ nAChRs levels (Wevers et al., 1999). Related to this, interactions between $A\beta$ and central cholinergic neurons (see the reviews Kar et al., 2004; Auld et al., 2002) have also been addressed in several transgenic models for AD where cholinergic pathology has been observed surrounding cerebral amyloidosis in both neocortex and hippocampus. For instance, coexistence of acetylcholinesterase-positive dystrophic neurites has been described in cortex and hippocampus of TgAPP22 mice (Sturchler-Pierrat et al., 1997), reorganization of cholinergic terminals with disappearance of ChAT immunostaining in transgenics with APP_{swe} (Tomidokoro et al., 2000), and reductions in density and size of the cortical and hippocampal cholinergic synapses in *APP*_{swe}+*PSI*_{M146L} double transgenics (Wong et al., 1999). In APP/London mice there is reorganization of acetylcholinesterase-positive fibers within the hippocampus, intense cortical acetylcholinesterase activity with presence of dystrophic acetylcholinesterase-positive fibers and also reduction in size of medial septum cholinergic neurons (Bronfman et al., 2000), while in TgAPP23 mice cortical amyloidosis correlates with decreased ChAT activity and cholinergic neocortical fiber loss (Boncristiano et al., 2002). Also, as mentioned above, loss of $\alpha 7$ nAChRs in $3 \times$ Tg-AD mice is found in brain regions that show intraneuronal $A\beta_{42}$ accumulation when early synaptic and cognitive deficits are already described (Oddo et al., 2005).

In vitro, $A\beta$ strongly binds to $\alpha 7$ nAChRs (Wang et al., 2000; Dineley et al., 2001) and it is thought that internalization of an $A\beta$ -nAChRs complex may lead to a buildup of intracellular $A\beta$, which alters neuronal function including proteasome activity (LaFerla et al., 1995; D'Andrea et al., 2001; Nagele et al., 2002; Oddo et al., 2004; Tseng et al., 2004). Increases of intracellular Ca^{2+} concentration induced by $A\beta$ binding to nAChRs (Dineley et al., 2002) or due to direct activation of nAChRs with nicotine (Hellstrom-Lindahl et al., 2000; Wang et al., 2003) can also lead to activation of Ca^{2+} -dependent kinases and pathways, further leading to increased tau phosphorylation and microtubule destabilization (Wang et al., 2003; Álvarez et al., 1999; Busciglio et al., 1995; Takashima et al., 1993). Moreover, although chronic administration of nicotine may reduce β -amyloidosis (Hellstrom-Lindahl et al., 2004; Nordberg et al., 2002) it also exacerbates tau pathology in $3 \times$ Tg-AD mice (Oddo et al., 2005). Therefore, nAChRs receptors have been suggested to be a potential link not only between $A\beta$ pathology and cholinergic dysfunction, but also $A\beta$ and tau pathology (Oddo et al., 2005).

3.5. The relevance of longitudinal studies

Longitudinal studies have been critical in defining the chronology of age-dependent cognitive deficits in humans (i.e. Artero et al., 2003) as well as the progression of

neuropsychiatric diseases (e.g. Starkstein et al., 2005). They are recommended as well in the behavioral assessment of transgenic models for AD (see the guidelines put forth by Janus and Westaway, 2001). Such an approach has been utilized in $3 \times \text{Tg-AD}$ mice where a set of animals was studied at 2, 6, 9, 12, 15 and 18 months in the Morris water maze (MWM), inhibitory avoidance (IA), novel object recognition (OR) and open-field activity measures (Billings et al., 2005). Two month-old, prepathologic mice were cognitively unimpaired (see also Fig. 1) while at 4 months the earliest cognitive impairment was manifested as a deficit in long-term retention, correlating with the accumulation of intraneuronal $A\beta_{42}$ in the hippocampus and amygdala. Short- and long-term memory impairments emerged in the hidden platform MWM (see also Fig. 2), OR and IA tasks in mice by 6 months of age, correlating with the LTP deficits and intracellular $A\beta$ accumulation which precedes extracellular deposits in these mice. These results also strongly indicate a role for intracellular $A\beta$, in the absence of structural changes, in cognitive decline in AD. These early cognitive deficits are likely due to functional alterations in the absence of overt structural alterations (plaque or tangle pathology), whereas structural alterations contribute to further cognitive dysfunction at later time points (see also Figs. 3 and 4). This cognitive decline is coincident with the neuropathology, with 18-month-old mice (widespread pathology with extensive

plaques, tangle buildup and inflammation) being unable to acquire platform location in the MWM. The evaluation of naive mice in the MWM and IA, to control for savings due to longitudinal training and testing, unraveled a profound effect of training in 12-month-old mice, as previous cognitive experience reduced the cerebral pathology and led to improved behavior. Unfortunately, by 18 months of age this effect disappeared. Moreover, in the same study, clearance of the intraneuronal $A\beta$ pathology by immunotherapy rescued the early cognitive deficits on spatial reference memory, a hippocampal-dependent task and reemergence of the intraneuronal $A\beta$ again led to retrogression of cognitive deficits. However, fear deficits were not rescued, nor was $A\beta$ cleared from amygdala with an i.c.v. injection of $A\beta$ antibody. Overall, this study strongly implicated intraneuronal $A\beta$ in the onset of cognitive dysfunction.

4. Modeling the neuropsychiatric symptoms of dementia

Most of the research on AD has focused on the molecular and neuropathological features of this disease and the characteristic cognitive deficits associated with it. However, neuropsychiatric symptoms of dementia are quite prevalent among these patients and are known to be the most important source of distress, as well as being a physical and psychological burden for family and

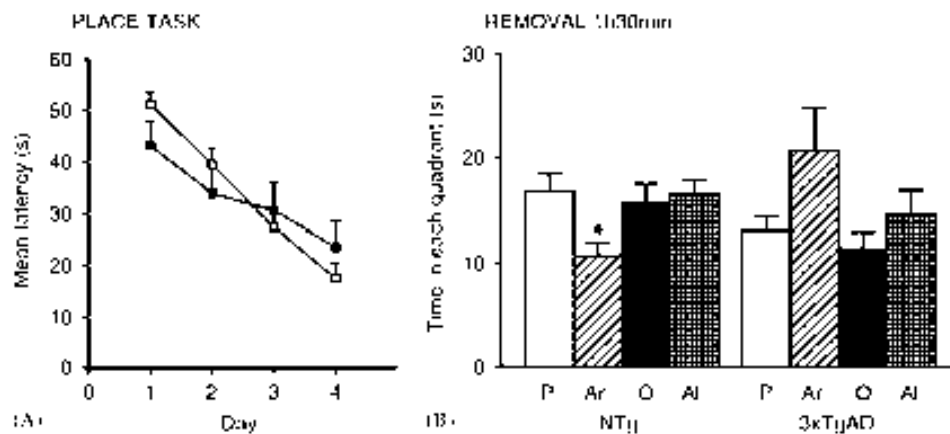


Fig. 1. Absence of learning and memory deficits in 2.5-month-old $3 \times \text{TgAD}$ mice in the MWM. *Subjects:* See legend Table 1. *Experiment 2:* At 2.5 months of age an absence of $A\beta$ intra- and extracellular-immunoreactivity (IR) has been described in $3 \times \text{TgAD}$ (Oddo et al., 2003a). Cognitive abilities of adult $3 \times \text{TgAD}$ (black squares) or $3 \times \text{TgAD}$ ($n = 13$) and non-transgenic (white squares) or NTg ($n = 13$) male mice at this age was assessed in three paradigms for learning and memory (L&M) in the MWM. The mice were trained to locate a platform (7 cm diameter) in a circular pool (Intex Recreation Corp., CA, USA; 91 cm diameter, 24 °C opaque water with 20 cm height) located in a test room with distal visual cues. Animals failing to find the platform were placed on it for 15 s, the same time period as for the successful animals. *Days 1–4, place learning.* The mouse was gently released (facing the wall) from one randomly selected starting point (N, S, E or W) and allowed to swim until it reached the platform (1.5 cm below the water surface, in the middle of SE). Escape latency was recorded in four-trial sessions per day, with trials spaced 15 min apart. *Day 4, Removal or probe trial (1 h 30 m).* One hour and thirty minutes after the end of session 4, the platform was removed from the maze and the mice performed a 'probe trial' of 60 s. Annulus crossings and the time spent in each quadrant were measured by a video-computerized tracking system (SMART, Panlab S.L., Barcelona, Spain). In previous experiments (Billings et al., 2005; pilots of the present study not shown), a *cued morris water maze task* (platform 1 cm above the water level and position indicated by a visible striped flag) was administered to control for visual abilities, motivation and possible differences between the two genotypes in swim speed. *Results:* Results are means \pm SEM. The analysis of the performances showed that all the mice exhibited identically good acquisition patterns in a place learning task (MANOVA, 'day' effect: $F_{3,72} = 35.718$, $P < 0.001$; 'genotype \times day' interaction effect: $F_{3,72} = 3.176$, $P < 0.05$ and 'genotype' effect: $F_{1,24} = 0.048$, *n.s.*), lack of preference for the trained quadrant (P) as compared to adjacent right (Ar) and left (Al) or opposite (O) quadrants in the probe trial (Duncan's test, $*P < 0.05$ vs. other quadrants) and a similar number of annulus crossings (mean \pm SEM, NTg: 7.2 ± 1.1 ; $3 \times \text{TgAD}$: 4.2 ± 1.0 , Student's *t*-test, *n.s.*).

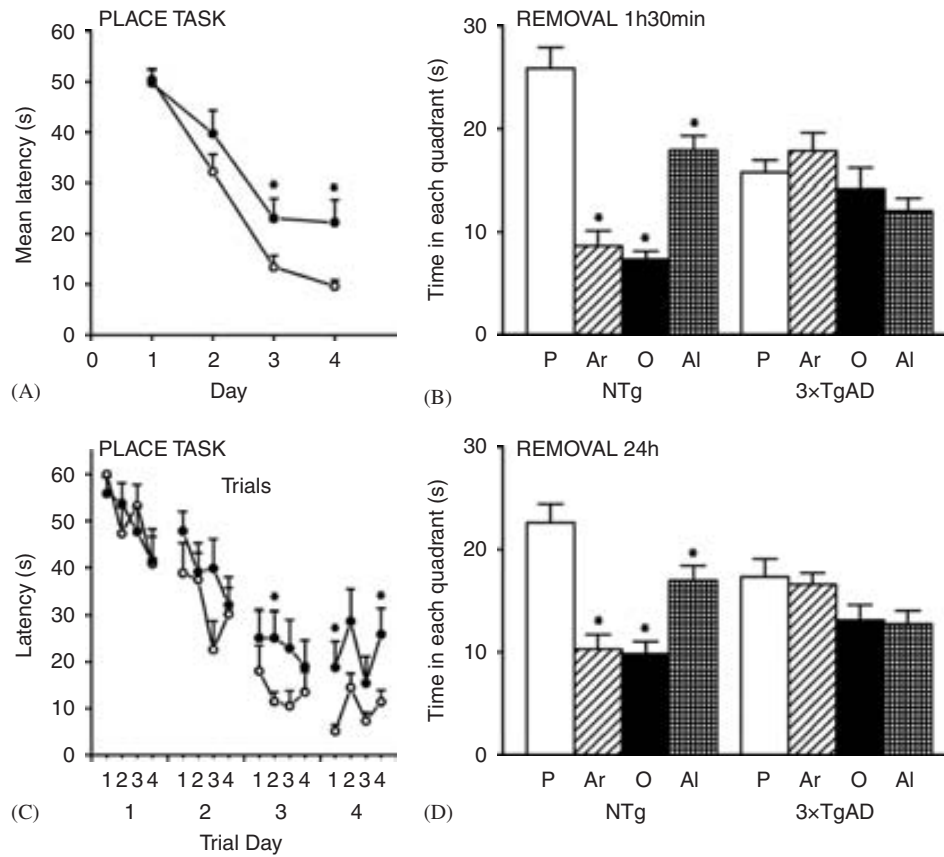


Fig. 2. Learning and memory deficits in 6-month-old 3 × TgAD mice in the MWM. *Subjects:* See legend Table 1. *Experiment 2:* At 6 months of age the presence of intraneuronal A β immunoreactivity and hippocampal synaptic deficits on LTP have been reported in 3 × TgAD by Oddo et al. (2003a, b). Cognitive abilities of 3 × TgAD (black circles or 3 × TgAD, $n = 13$) and non-transgenic animals (white circles or NTg, $n = 13$) at this age were assessed in four paradigms for learning and memory in the MWM. *Days 1–4, place learning and removal (1 h 30 m)* as described in Fig. 1. *Day 5, Removal or probe trial (24 h):* Twenty-four hours later, a second probe trial was administered. Lack of differences in visual abilities, motivation and swim speed had been previously demonstrated in a *cued morris water maze task* (Billings et al., 2005; pilots of the present study not shown). *Results:* Results are means \pm SEM. (A and B) The analysis of the performances showed that, as compared to NTg animals, 3 × TgAD mice exhibited a poorer acquisition pattern in a place learning task (Fig. 2A, MANOVA, ‘day effect’: $F_{3,24} = 57.145$, $P < 0.001$; ‘genotype \times day’ interaction effect: $F_{3,72} = 1.792$, *n.s.* and ‘genotype’ effect: $F_{1,24} = 6.612$, $P < 0.05$; Fig. 2B, * $P < 0.05$ vs NTg mice on days 3 and 4, Student’s *t*-test). (C) In the probe trial for short-term memory, 3 × TgAD mice did not distinguish between the trained quadrant (P) and the adjacent (Ar, Al) or the opposed one (O) while NTg showed the expected preference (Duncan’s test, * $P < 0.05$, other quadrants vs. trained one). They also performed fewer annulus crossings than did NTg mice (mean \pm SEM, NTg: 9.0 ± 1.2 ; 3 × TgAD: 5.2 ± 1.1 , Student’s *t*-test, $P < 0.05$). (D) Once again, in a probe trial for long-term memory, the 3 × TgAD still showed equal preference between all quadrants in contrast to preference for the trained quadrant exhibited by NTg mice, although both groups did not differ in the number of annulus crossings (mean \pm SEM, NTg: 7.6 ± 1.2 ; 3 × TgAD: 6.7 ± 1.3 , Student’s *t*-test, *n.s.*).

professional caregivers (i.e. Tan et al., 2005), both dramatically affecting patient and caregiver quality of life (Shin et al., 2005), and frequently leading to institutionalization (Hope et al., 1998). Paranoia and delusion, hallucinations, activity disturbances, aggressiveness, diurnal rhythm disturbances, affective disturbances, anxieties and phobias are the behavior clusters distinguished by behavioral assessment scales at the clinical level (Reisberg et al., 1987), being commonly referred to as “Behavioral and psychological symptoms of dementia (BPSD)”. If modeling the memory loss characteristic of AD in transgenic mice has been challenging, studying the validity of these animal models with respect to these non-cognitive symptoms remains an even more difficult goal. In this quest, behavioral abnormalities such as neophobia, seizures, and increased aggression or locomotor activity have

often been described in various types of transgenic mice (see i.e. Janus and Westaway, 2001; Auld et al., 2002).

4.1. Activity disturbances and circadian rhythms

Besides an age-dependent decline of cognitive functions, APP23 (van Dam et al., 2003; Feng et al., 2004) and TgCRND8 AD (Ambrée et al., 2006) mice have been shown to display cage activity disturbances possibly resulting from altered APP metabolism or A β levels, and which are similar to those alterations in circadian rhythm related to AD (van Someren et al., 1996; Harper et al., 2004). Detailed evaluation of the activity patterns of TgCRND8 from early ages onward has revealed not only increased total activity but also stereotyped behavior mainly occurring during the first hours of the dark period

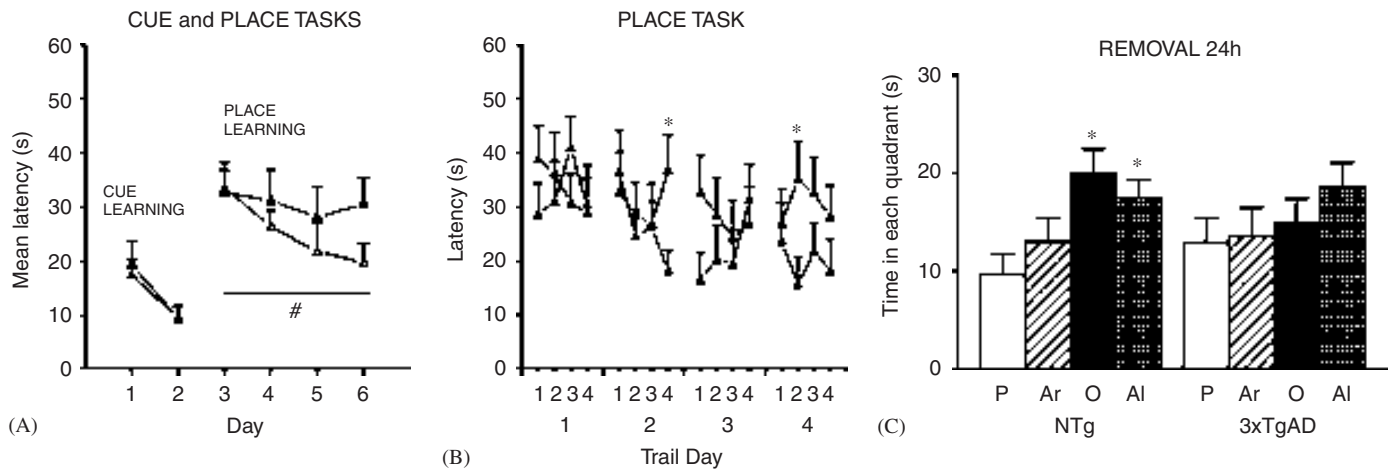


Fig. 3. Acquisition and retention deficits in 12-month-old 3 × TgAD females in the MWM. *Subjects*: See legend Table 1. *Experiment 3*: At 12 months of age complete A β plaque deposits and early stages of tau pathology (mislocation) have been described in 3 × TgAD mice by Oddo et al. (2003a,b). Cognitive abilities of 3 × TgAD (black triangles or 3 × TgAD, $n = 12$) and non-transgenic animals (white triangles or NTg, $n = 10$) at this age were assessed in several paradigms for learning and memory (L&M) in the MWM. Mice were trained to locate a platform (16 cm diameter) in a circular pool (home-made, 140 cm diameter, 24 °C opaque water with 60 cm height) located in a test room with distal visual cues. Mice failing to find the platform were placed on it for 15 s, the same time period as the successful animals. *Days 1–2, cue learning*: The mouse was gently released (facing the wall) from one randomly selected starting point (N, S, E or W) and allowed to swim until it reached the visible platform (1.5 cm above the water level and with a striped flag 5 × 8 cm, 15 cm height) located in the NE. Escape latency was recorded in four trials of 60 s/day, with trials spaced 15 min apart. *Days 3–6, place learning*: Escape latency was recorded in four trial sessions per day. *Day 7, Removal or probe trial (24 h)*. Twenty-four hours later, the platform was removed from the maze and the mice performed a ‘probe trial’ of 60 s. Annulus crossings and the time spent in each quadrant were measured by a video-computerized tracking system (SMART, Panlab S.L., Barcelona, Spain). *Results*: Results are means \pm SEM. (A) The analysis of the performances showed a high efficiency to reach the platform in the cue learning task. Although MANOVA showed no ‘genotype’ ($F_{1,20} = 0.625$, $P = 0.438$, *n.s.*), ‘day’ or ‘day \times genotype’ interaction effects (both $F_{3,60} < 0.864$, $P < 0.465$, *n.s.*), the acquisition of the place task was poorer in 3 × TgAD mice as revealed by smaller averaged reduction of mean latency between two consecutive days (mean \pm SEM, average of the mean latency of day 4 minus that of day 3, day 5 minus day 4, and day 6 minus day 5: 3 × TgAD 0.22 ± 1.29 ; NTg -5.71 ± 1.95 , Student’s *t*-test, $\#P < 0.05$). (B) Deficits could be also observed on particular trials (Student’s *t*-test, $*P < 0.05$ vs. NTg mice on days 2 and 4). (C) In the probe trial neither of both aged groups showed preference for the trained quadrant (P), with a similar, low number of annulus crossings (mean \pm SEM, NTg: 2.3 ± 0.68 ; 3 × TgAD: 1.9 ± 0.6 , Student’s *t*-test, *n.s.*) and, NTg spent even more time in the opponent and adjacent left quadrants than expected (NTg, ANOVA, $F(4, 49) = 3.883$, $P < 0.01$, Duncan’s test, $*P < 0.05$). There were no differences between the two genotypes in swim speed.

(Ambrée et al., 2006). With increasing age, this aberrant behavior is more widely spread over 24 h and correlates significantly with corticosterone metabolites, suggesting that stereotypy and BPSD may share underlying mechanisms (see Section 4.2). In APP23 mice, increased activity during the second half of the nocturnal active phase has also been recently demonstrated (Vloeberghs et al., 2004) and seems to be reminiscent of the exacerbation of agitation and other behavioral symptoms in the late afternoon or evening, characteristic of the sundowning syndrome frequently observed among AD patients (Vitiello et al., 1992; Bliwise, 1994). In 3 × TgAD mice, at ages preceding plaque deposition (between 2 and 6 months old) similar total daily activity is observed (see new results presented in Table 1). However, at the age of 6 months, when intracellular A β immunoreactivity, synaptic LTP deficits (Oddo et al., 2003 a,b) and learning and memory deficits (Billings et al., 2005; also new results presented in Fig. 2) are detected, 3 × TgAD mice show a trend toward an increased nocturnal/diurnal activity relationship when compared to the index in the non-transgenic mice (see new results presented in Table 1).

In spite of alterations in 24 h activity rhythms seeming to be a common symptom in human AD and have been also

observed in APP mice, some other studies have reported age-dependency, or even the opposite situation. Thus, hyperactivity has been only observed in young and adult, but not aged, PDAPP animals carrying the London mutation driven by a PDGF-B promoter (Huitrón-Reséndiz et al., 2002), whereas hypoactivity during the (active) dark phase is exhibited by female App751 (Moran et al., 1995) and NSE-hAPP751m-57 mice expressing human APP harboring the London (V717F) AD mutation (D’Hooge et al., 1996), as compared to their respective non-transgenic controls.

Changes in activity rhythms are intrinsically related to sleep-wake states. Nevertheless, sleep disturbances are another clinical manifestation of AD (Ancoli-Israel et al., 1989), typified by frequent awakenings during the night and an increment in the propensity to sleep during daytime (Ancoli-Israel et al., 1989; Okawa et al., 1991; Satlin et al., 1995). This sleep fragmentation may have important consequences on memory processes (see Smith, 1985; Graves, et al., 2001), an issue that has been nicely addressed in PDAPP mice by Huitrón-Reséndiz et al. (2002, 2005). In the light period, their young transgenic mice (at ages preceding A β plaque deposition) showed selective deficits in spatial learning and a reduction of

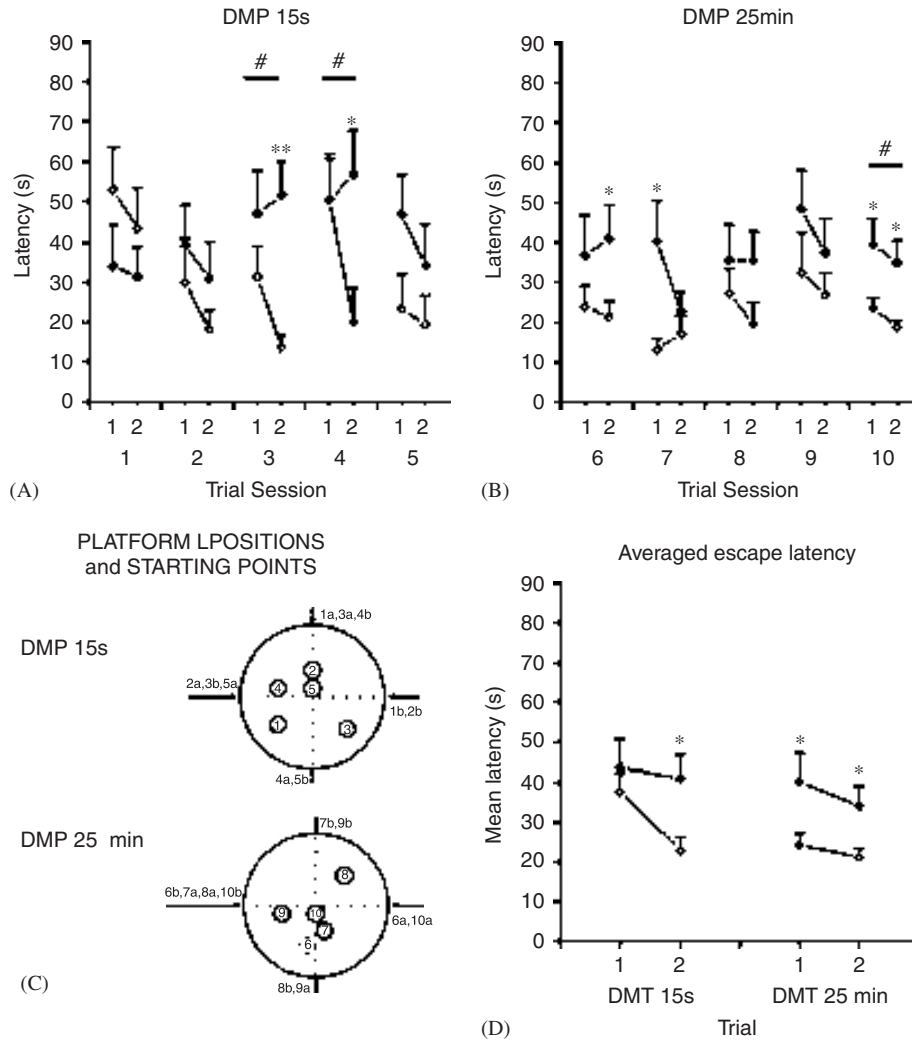


Fig. 4. Learning and memory deficits in 12-month-old 3 x TgAD females in two delayed matching-to-place tasks in the water maze. *Subjects:* See legend Table 1. *Experiment 3:* Follows Fig. 3. The day after the probe trial (*Removal 24 h*), 12-month-old female 3 x TgAD (*n* = 13) and non-transgenic animals (white diamonds or NTg, *n* = 13) were subjected to a delayed rendition of the matching-to-place (DMP) version of the MWM task. In this task, known to depend on hippocampal CA3 NMDA receptors (Nakazawa et al., 2003), the animal's ability to solve a novel location of the hidden platform with just one visiting trial is tested a few minutes later (Steele and Morris, 1999; Morris and Frey, 1997). The animals were trained for 5 days and a total of 10 sessions with platform positions and starting points changing every session (see illustration C). Two sessions (morning and afternoon) were administered per day with 2 consecutive trials of 90 s each (respectively: a or b, in figure A; 1 or 2 in the other figures). Mice failing to find the platform were placed on it for 15 s, the same period as the successful animals. Two different intertrial intervals were used: *Sessions 1–5, DMP 15s:* 15 s (figure B); *sessions 6–10, DMP 25 min:* 25 min (Fig. C). *Results:* Results are means \pm SEM. (A) Genotype differences were observed in sessions 3 and 4 for DMP 15 s, as the escape latencies of the second trial were higher in 3 x TgAD mice (Student's *t*-test; ***P* < 0.001 and **P* < 0.05) and on these days they also failed to improve their performance in the second trial (Student's *t*-test, difference between the second trial and the first one, both *P* < 0.05 vs. NTg mice). (B) Genotype differences were also found in sessions 6, 7 and 10 for DMP 20 min on escape latencies of the first trial and/or second trial (Student's *t*-test; all **P* < 0.05) and, once again, they failed to improve their performance in the second trial of the tenth session (Student's *t*-test; difference between latency in the second trial and the first one; 1-tailed *P* < 0.05 vs. NTg mice). (D) Averaged escape latencies of all the first trials ('1a, 2a, 3a, 4a, 5a'), the second trials ('1b, 2b, 3b, 4b, 5b') of the 5 sessions for DMP 15s, as well as those of the DMP 25 min ('6a, 7a, 8a, 9a, 10a' and '6b, 7b, 8b, 9b, 10b', respectively) showed worse performance of 3 x TgAD as compared to NTg mice (Student's *t*-test, **P* < 0.05), suggesting that "working memory" (DMP15s; Whishaw, 1985) and/or the ability to "learn the rule that platform position changes every session" are also impaired in old 3 x TgAD mice.

REM sleep, and were those who show increased nocturnal motor activity as compared to young non-transgenic animals. Aged PPAPP mice exhibited more pronounced deficits in spatial learning and in the distribution of their diurnal sleep-wake states, while during the nocturnal active phase they were more awake and had reduced REM sleep compared to their age-matched non-Tg littermates.

Aged-related deficits in thermoregulation are more pronounced in AD (Okawa et al., 1991) and have been reproduced in aged but also young PPAPP mice (Huitrón-Reséndiz et al., 2002). Those animals showed significantly lower core body temperature than their age-matched non-transgenic littermates, although no differences in locomotor's activity could be found at this age. Therefore, deficits

in neural mechanisms regulating cognitive functions and arousal are observed in young PDAPP mice also before A β amyloid plaque formation.

Alteration in circadian patterns of food intake and disturbed appetite are associated with measures of functional and cognitive deterioration in seniors with probable AD (e.g. Greenwood et al., 2005). The presence of psychomotor disturbances, including irritability, agitation and disinhibition are strongly associated with shifts in eating patterns towards carbohydrates and away from protein, resulting in lower 24-h energy intakes. Some animal models for Down syndrome have effectively reported a significant decrease in body mass from early ages (Chrast et al., 2000), but discrepancies are found in other animal models for AD, probably depending on the kind of harbored mutation/s and amino acid position. Thus, body weight loss is reported in APP23 mice (β APP₇₅₁SWE, Lalonde et al., 2002), normal body weight in β APP₆₉₅SWE (Lalonde et al., 2003a) but elevated weight relative to controls in PS1/A246E transgenic mice

(Lalonde et al., 2003b) as well as in adult and old 3 \times TgAD (*PS1*_{M146V}, *APP*_{Swe}, *tau*_{P301L}, present results in Table 1).

In summary, most of these studies provide evidence that these murine AD models exhibit memory and neurophysiological deficits at ages preceding A β plaque formation, which are worsened with age and A β extracellular deposition. Thus, the circadian rhythm disturbances, the sundowning-like behavior, the stereotyped behavior, the sleep disturbances, and the poor thermoregulation or weight loss described in these models appear from very early ages, before A β pathology can be detected, suggesting that some of the non-cognitive symptoms may potentially occur in Alzheimer patients during those mild and moderate phases of the neurological disorder years before the major symptoms of the severe phases appear (Cummings and Benson, 1992; Cummings et al., 1998). These results therefore reinforce a probable role for the intracellular occurrence of A β in modifying neurophysiological homeostasis.

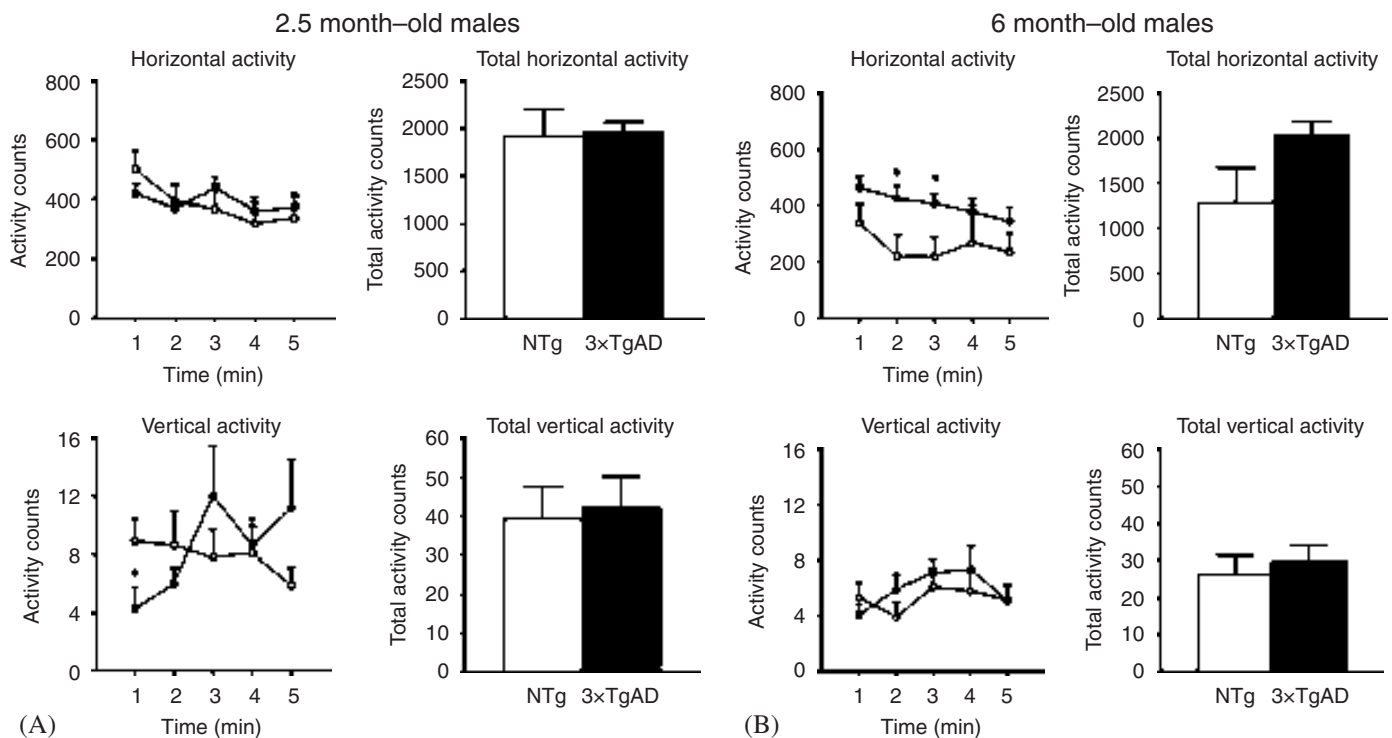


Fig. 5. Changes in spontaneous horizontal and vertical activities in adult 3 \times TgAD male mice assessed for 5 min in activity meter cages (35 \times 35 \times 25 cm). *Subjects:* See legend Table 1. *Experiment 1:* Follows Table 2. *Behavioral analysis and Results:* After assessment of sensorimotor function, the spontaneous activity of one set of adult 2.5- and 6-month-old 3 \times TgAD (black bars or 3 \times TgAD) and NTg (white bars or NTg) male mice was studied in a multicage photocell activity meter system (Panlab, S.L., Barcelona, Spain). Four mice were evaluated per day (2 of each genotype and the same age) in individual testing cages (35 \times 35 \times 25 cm), similar to the home cage, covered by a grid and containing clean sawdust, food and water. The first 5 min of the test were analyzed as the initial spontaneous activity developed in the cage and are represented here (means \pm SEM). *Results:* As expected, spontaneous activity developed immediately after the animals were placed in the test cage and was mainly invested in exploratory behavior. (A) Similar total horizontal and vertical activity counts were recorded during the first 5 min of the test in 3 \times TgAD and NTg animals. However, the analysis of the temporal activity curves showed that, at 2.5 months of age, significantly lower vertical activity was developed during the first minute of the test by 3 \times TgAD (dark circles, $n = 9$) as compared to age-matched NTg mice (white circle, $n = 10$) (Student's t test, $*P < 0.05$). (B) At 6 months of age the trend toward increased total horizontal activity shown by 3 \times TgAD mice (dark circles, $n = 9$) as compared to their respective NTg controls (white circles, $n = 10$) reached statistical significance when the time course of horizontal activity was analyzed (Student's t -test, $*P < 0.05$). Such an increase was not seen for vertical activity, suggesting that behavior was devoted to horizontal displacements more than to exploratory behavior per se (among other measures of motor activity, vertical activity is described in the literature as the most sensitive variable to distinguish exploratory behavior changes).

4.2. Emotional and psychotic symptoms

Psychotic (delusion, hallucinations, aberrant motor activity) and emotional symptoms (agitation, dysphoria, anxiety, irritability, apathy) are important BPSD in patients with mild AD as well as those with moderate and severe AD (Shimabukuro et al., 2005). Apathy, aberrant motor activity, dysphoria and anxiety are the symptoms most frequently reported by their caregivers (see i.e., Piccininni et al., 2005). Apart from hallucinations, all these BPSD are present starting from a mild degree of dementia and a clear trend toward increasing frequency with both the severity and duration of the disease is found for delusions, hallucinations and aberrant motor activity (Piccininni et al., 2005).

Although paranoia, delusion and hallucinations are human behavioral traits difficult to characterize in the phenotyping of AD-animal models, other symptoms such as aberrant motor activity, apathy, aggressiveness, affective disturbances and anxieties have been more or less successfully addressed. For instance, repetitive, unvarying behavioral patterns without any obvious function, resembling the aberrant stereotypic behaviors in some psychiatric diseases and AD (Mason, 1991), have been described in APP23 or β APP₇₅₁SWE (Lalonde et al., 2002), PS1-A245E

(Lalonde et al., 2003b) and TgCRN8 mice (Ambrée et al., 2006). APP23 mice often rear and jump continuously against the walls of their home cage, and similar behavior has also been described in TgCRN8 mice, with dopamine (DA), serotonin and opioids being proposed as neurochemical bases of these stereotyped behaviors (Cabib, 1993; Pappert et al., 1998; Garner and Mason, 2002). In the latter study, the automated behavior appeared in TgCRN8 mice from early ages and worsened with aging, thus resembling the above-mentioned temporal course observed in patients. At older ages, the high amount of stereotypes correlated with an elevated corticosterone metabolite concentration in fecal samples, thus leading to the suggestion that this aberrant motor activity behavior could be a measure of the lower ability of aged transgenic mice to cope with stressors. In fact, stressful stimuli are known to lead to increases of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis activity (von Holst, 1998) as well as increased extracellular DA concentrations in mesolimbic, mesostriatal and mesocortical DAergic pathways (Pani et al., 2000; Giorgi et al., 2003). On the other hand, elevated DA levels are known to be able to elicit stereotypes in rodents (Mason, 1991), and in the present animal models they could be indirectly caused by hippocampal AD pathology as an effect of HPA axis hyperactivity and the

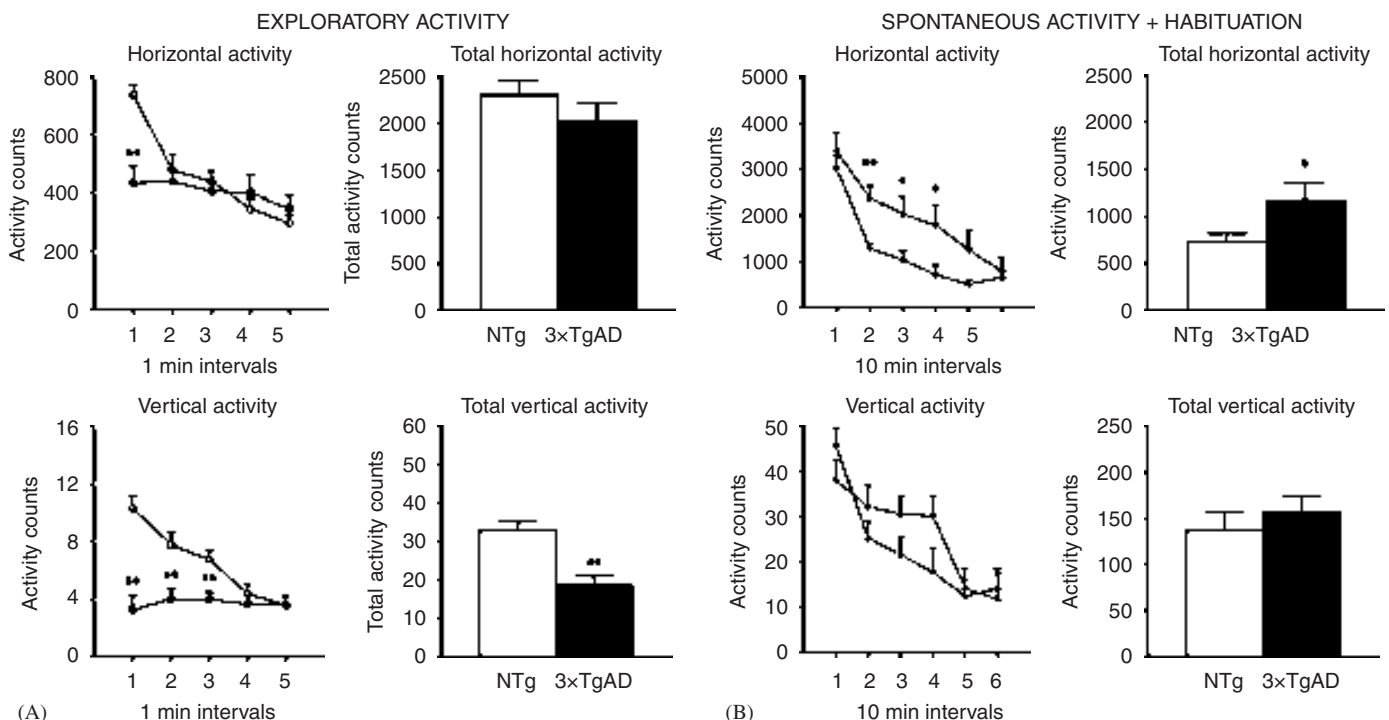


Fig. 6. Altered spontaneous horizontal and vertical activity of 12-month-old 3 × TgAD female mice assessed in activity cages (40 × 40 × 40 cm) for 5 min or 1 h. **Subjects:** See legend Table 1. **Experiment 3:** Follows Table 3. **Behavioral analysis and Results:** At the end of the behavioral battery of tests, the spontaneous activity of the two sets of aged females was analyzed. Reduced total vertical activity, but similar total horizontal activity, counts were recorded in 3 × TgAD (black bars, $n = 12$) as compared to non-transgenic mice (white bars, $n = 10$) during the first 5 minutes of the test, when spontaneous activity is known to be mainly invested on exploratory behavior (Giménez-Llort et al., 1995). The analysis of the temporal activity curves also shows an initial reduction of horizontal activity (the first minute of the test, Student's t -test, $*P < 0.05$) in 3 × TgAD mice (dark circles) as compared to controls (white circles), and that the reduction of total vertical activity was due to sustained low vertical counts from the first minute onward (Student's t -test, $*P < 0.05$). This drastic reduction in exploratory behavior is followed by a lower ability to habituate to the test cage, as the 3 × TgAD mice need 40 min to reduce their activity in half while non-transgenic animals did it in only 20 min.

glucocorticoid cascade postulated by Sapolky et al. (1986). Nevertheless, age- and sex-dependent hyperactivity of the HPA axis has been demonstrated in the TgCRN8 mouse model (Touma et al., 2004) and increased sensitivity to physiological stressors associated with aberrancies in HPA function has been also reported in transgenic mice expressing a mutant form of human APP (Pedersen et al., 1999). In fact, dysregulation of the stress-responsive HPA axis is another feature of AD at the neuroendocrine level (Maeda et al., 1991; Hatzinger et al., 1995). In the same vein, increases in DA content (Gsell et al., 2004) and reduced striatal D2 receptors in the striatum have been described in AD patients (Cross et al., 1984; Seeman et al., 1987; Pizzolato et al., 1996; Joyce et al., 1998; Kempainen

et al., 2000) and have been correlated with severe behavioral abnormalities (Tanaka et al., 2003).

The above-mentioned lack of ability to cope with mild stressors (e.g. novelty) has also been seen in 3 × TgAD mice. Changes in spontaneous horizontal and vertical activities with reduced initial exploratory behavior and increased deambulation have been observed in adult 3 × TgAD male mice at ages preceding any presence of Aβ (see new results presented in Fig. 5, 2.5 months old), or when only intracellular Aβ immunoreactivity and synaptic deficits were found (see Fig. 5, 6 months old). At older ages, a reduction in exploratory behavior is more drastic (see Fig. 6A, 12 months old) and it is followed by a lower ability to habituate to the novelty of the test (see Fig. 6B).

Table 2

Somatic growth, sensorimotor function and circadian activity in adult 3 × TgAD male mice

Experiment 1	2.5 months old		6 months old	
	Non-transgenic	3 × TgAD	Non-transgenic	3 × TgAD
(A) Somatic growth	<i>n</i> = 10	<i>n</i> = 9	<i>n</i> = 10	<i>n</i> = 9
Experiment 1: weight (g)	28.8 ± 0.7	31.9 ± 2.0 n.s.	33.8 ± 1.0	43.3 ± 1.7*
[Experiment 2: weight (g), all <i>n</i> = 13]	[27.1 ± 0.5]	[30.0 ± 0.8*]	[31.1 ± 0.8]	[39.5 ± 1.3][*]
(B) Sensorimotor function				
<i>Wood rod test (two 20-s trials)</i>				
Balance (total falling latency, s)	40 ± 0.0	40 ± 0.0 n.s.	37.5 ± 2.5	40 ± 0.0 n.s.
Coordination (total distance, cm)	13.5 ± 8.6	11.7 ± 3.8 n.s.	6 ± 2.4	2.8 ± 1.2 n.s.
<i>Wire rod test (two 20-s trials)</i>				
Balance (total falling latency, s)	22.6 ± 3.2	29.4 ± 2.6 n.s.	17.8 ± 3.6	26.1 ± 4.1 n.s.
Coordination (total distance, cm)	2.0 ± 1.1	0 ± 0.0 n.s.#.	0.5 ± 0.5	0 ± 0.0 n.s.#.
<i>Wire hang test (two 5-s trials)</i>				
Strength (total time hold, s)	10.0 ± 0.0	10.0 ± 0.0 n.s.	9.3 ± 0.5	9.6 ± 0.3 n.s.
Coordination (total distance, segments)	4.4 ± 0.7	4.1 ± 0.6 n.s.	1.2 ± 0.4	1.7 ± 0.6 n.s.
<i>Wire hang test (one 60-s trial)</i>				
Resistance (time hold, s)	33.1 ± 7.7	56.4 ± 3.0*	31.9 ± 7.7	42.9 ± 6.9 n.s.
Coordination (distance in segments)	3.4 ± 0.5	3.6 ± 0.3 n.s.	2.7 ± 0.5	3.4 ± 0.3 n.s.
(C) Spontaneous activity				
Horizontal activity—5 min	See Fig. 5A		See Fig. 5B*	
Vertical activity—5 min	See Fig. 5A*		See Fig. 5B	
(D) Circadian activity				
Diurnal activity (8:30–20 h, counts × 10 ³)	164.3 ± 63.9	106.0 ± 50.8 n.s.	81.7 ± 66.2	34.5 ± 12.6 n.s.
Nocturnal activity (20–8 h, counts × 10 ³)	153.4 ± 56.6	83.1 ± 28.3 n.s.	145.8 ± 88.3	109.7 ± 54.5 n.s.
Total daily activity (counts × 10 ³)	317.7 ± 86.0	184.5 ± 68.1 n.s.	227.4 ± 157.0	144.2 ± 61.3 n.s.
Nocturnal/diurnal activity ratio	0.93 ± 0.28	0.78 ± 0.08 n.s.	1.78 ± 0.54	3.18 ± 1.18 n.s.
Defecations at 24 h	55.7 ± 4.2	66.8 ± 3.2 n.s.	52.7 ± 3.7	59.2 ± 4.4 n.s.

Subjects: See legend Table 1. **Experiment 1:** In this first experiment, one set of adult (2.5 and 6 months old) 3 × TgAD and NTg male mice were evaluated for sensorimotor function and circadian activity. At 2.5 months of age absence of Aβ intra- and extracellular immunoreactivity (IR) has been described in 3 × TgAD, while at 6 months presence of intraneuronal Aβ IR and hippocampal synaptic deficits on LTP have been reported in 3 × TgAD as compared to age-matched NTg mice (Oddo et al., 2003a). **Behavioral analysis and Results:** Results are means ± SEM. At each age: (A) No apparent somatic growth differences were observed between both groups of animals until 6 months of age, in contrast to observations in a second set of animals (*Experiment 2*, Figs. 7 and 8). Later (B) equal balance and motor coordination were recorded when animals were placed at the center of an elevated and 40 cm long wooden rod (1.1 cm wide) or a cylindrical metallic rod (diameter 1 cm). However, on the unstable cylindrical rod the 3 × TgAD refused any attempt at displacement (#). Similar strength and motor coordination were observed when animals were allowed to cling to the middle of a wire (diameter 2 mm, length 40 cm) with their forepaws, in two consecutive short 5-s trials and also in a third long 60-s trial, where 2.5 month-old 3 × TgAD even showed higher resistance than age-matched NTg mice. C and D) Four mice per day (2 of each genotype and the same age) were individually tested for 23.5 consecutive hours (beginning at 08:30 h) in a multicage photocell activity meter system (Panlab, S.L., Barcelona, Spain). Testing cages (35 × 35 × 25 cm) were similar to the home cage, being covered by a grid and contained clean sawdust, food and water. The first 5 min of the test were analyzed as initial spontaneous activity developed in the cage (see Fig. 5). All the animals developed a similar total amount of horizontal activity during each part and the total of a whole LD period, although there was a trend toward an increased night/day ratio in 6 month old 3 × TgAD as compared to age-matched NTg mice. **P* < 0.05, Student's *t*-test.

Neophobia, a common feature described in many APP transgenic mice (reviewed by Janus and Westaway, 2001), was also found to be increased when measured by the corner test in 12 old 3 × TgAD mice as compared to non-Tg animals (see Table 2).

Diminished curiosity and apathy have been described in AD patients (Daffner et al., 1992). Among all the BPSD, apathy is the only symptom that is continuously impaired

with the progression of disease severity and which is, at the same time, also the most severe symptom (e.g. Spalletta et al., 2004). Apathy was found to be within a physical behavior factor, as compared to agitation/aggression/irritability which were considered to be within a depressive symptom factor (Mirakhor et al., 2004). Several studies in transgenic animals expressing mutated, but also human wild type, β APP have reported decreases in spontaneous

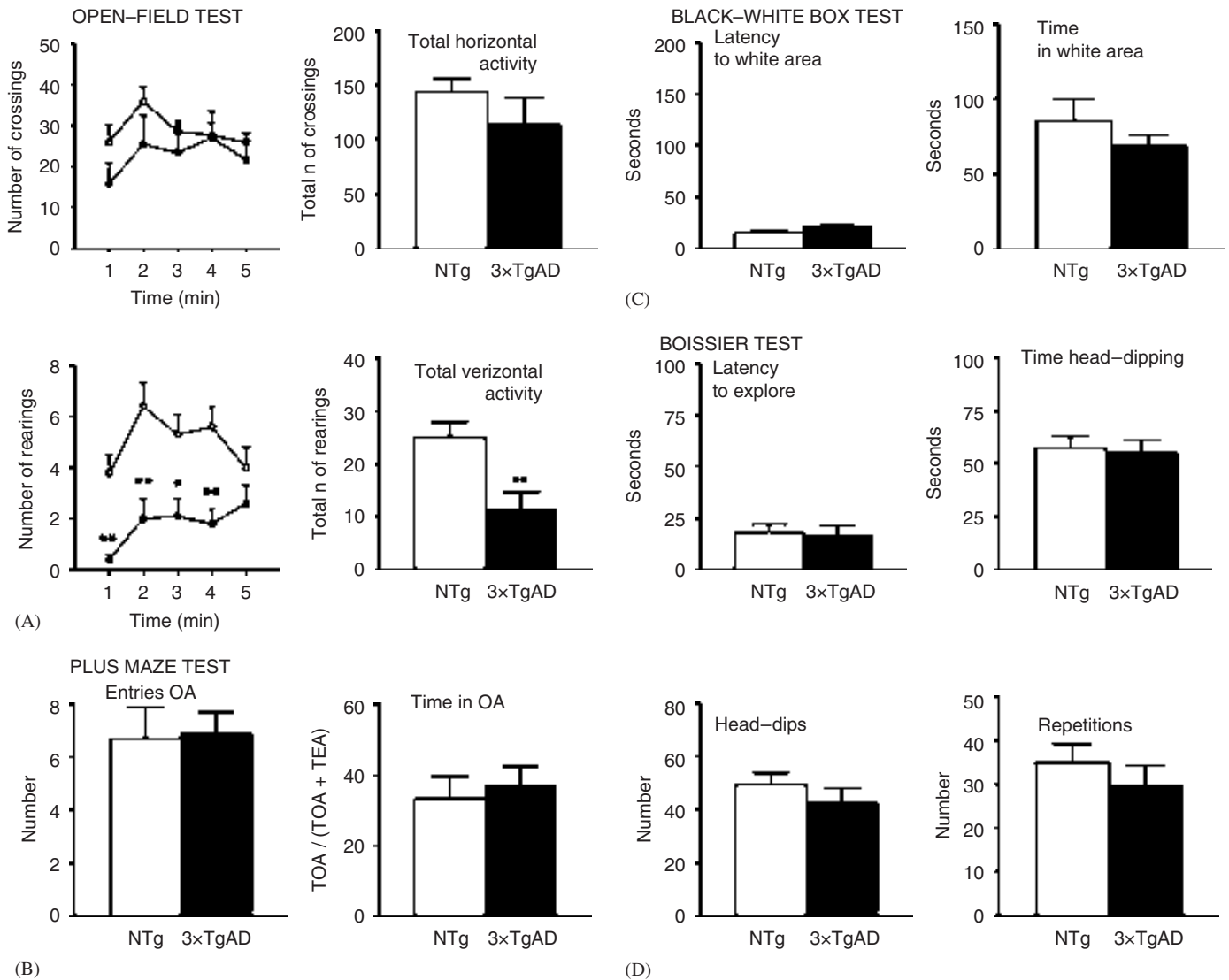


Fig. 7. Assessment of 2.5-month-old 3 × TgAD male mice in a series of tests for BPSD-like behaviors. *Subjects*: See legend Table 1. *Experiment 2, Behavioral analysis and Results*: After assessment of learning and memory in several paradigms in the MWM (Fig. 1), the set of 2.5-month-old 3 × TgAD (black bars or 3 × TgAD, $n = 13$) and non-transgenic mice (white bars or NTg, $n = 13$) successively confronted a series of tests useful to evaluate other behaviors closer to “behavioral and psychological symptoms of dementia” observed in humans. (A) *Open-field*: Strong initial reduction of exploratory behavior (vertical activity, rearings) was observed when 3 × TgAD animals were placed in the center of the apparatus (white woodwork, 55 × 55 × 25 cm high, 20 lux) and, although improved during the test, rearing behavior was always lower than in NTg mice, leading to reduced total vertical activity. Increased emotivity measured by means of a higher number of defecation boli was observed (see Table 4, Student’s t -test, * $P < 0.05$). Normal behavior was observed in the other tests. (B) *Plus maze*: The apparatus (black woodwork, 20 lux) consisted of two enclosed arms (EA, 30 × 5 × 15 cm) and two open arms (OA, 30 × 5 cm) forming a square cross with a 5 × 5 cm square centerpiece and elevated 40 above the floor. The animals were placed in the center of the plus-maze facing one of the EA and observed for 5 min. No genotype differences were found in the percentage of time spent in the OA, nor the number of entries (four paws criteria) into each arm. (C) *White-black box*: Equal latency to leave the black compartment (no light, 270 × 180 × 270 mm) and through an opening (70 × 70 mm) thereby entering the white compartment (red light, 20 lux, 270 × 270 × 270 mm) was observed in 3 × TgAD mice. Time spent in the white area was also similar to that recorded in NTg animals. (D) *Boissier’s 16-hole board test*: Similar exploratory behavior was recorded in this test for both genotypes (brown woodwork, 60 × 60 × 40 cm, 16 holes, 20 lux).

alternation rates in Y- and T-mazes (tests based on the animal's natural curiosity), in an age-dependent manner (i.e. Arendash et al., 2001; Holcomb et al., 1999; King and Arendash, 2002; Lalonde et al., 2003a), which already occurred before plaque onset (i.e. 3 months old β APP₆₉₅SWE; King and Arendash, 2002). According to Lalonde et al. (2002), this impairment could be due to a putative loss of motivation to explore, inhibitory control or spatial orientation similar to symptoms described for AD

(Chung and Cummings, 2000). Some of these studies also report open-field and Y-maze hyperactivity in old (Lalonde et al., 2003a) but also young pre-plaque β APP₆₉₅SWE mice (King and Arendash, 2002; King et al., 1999), which would exclude decreased curiosity as the underlying cause of the spontaneous alternation deficits. However, other authors have found a lack of change in activity in these animals in tests at ages in which plaque deposition is present (Chapman et al., 1999; Holcomb et al., 1999). It seems that

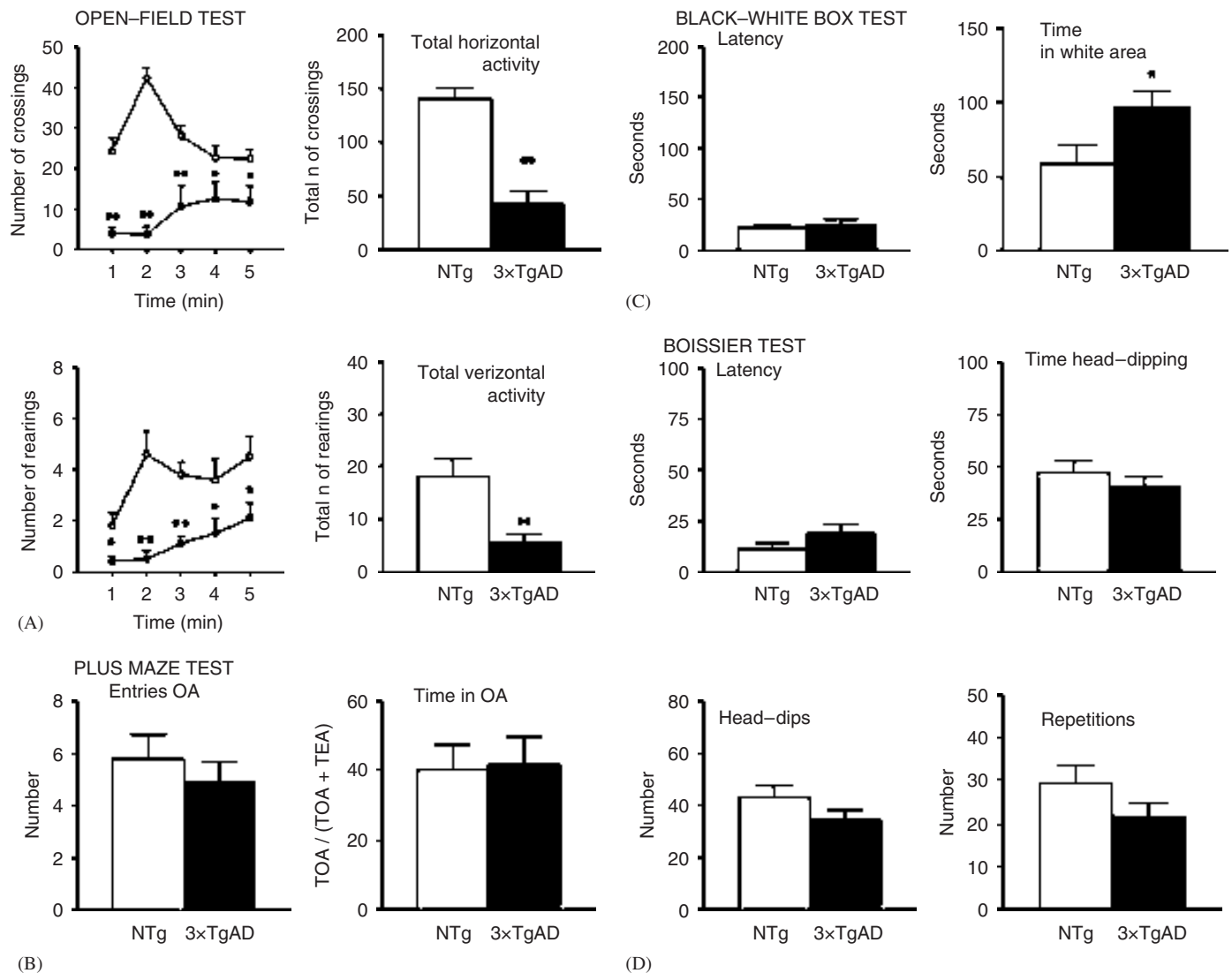


Fig. 8. BPSD-like changes in 6-month-old adult 3 × TgAD male mice. *Subjects*: See legend Table 1. *Experiment 2, Behavioral analysis and Results*: After assessment of learning and memory in several paradigms in the MWM (Fig. 2), the set of 6-month-old 3 × TgAD (black bars or 3 × TgAD, $n = 13$) and non-transgenic mice (white bars or NTg, $n = 13$) was successively confronted with a series of tests useful to evaluate other behaviors closer to “behavioral and psychological symptoms of dementia” observed in humans. (A) *Open-field*: Strong initial freezing behavior was observed when 3 × TgAD animals were placed in the center of the apparatus (white woodwork, 55 × 55 × 25 cm high, 20 lux). Thereafter reduced rearing (vertical activity) and forward locomotion (horizontal activity) were observed during subsequent minutes of the test, leading also to reduced total counts (Student's *t*-test, * $P < 0.05$). (B) *Plus maze*: The apparatus (black woodwork, 20 lux) consisted of two enclosed arms (EA, 30 × 5 × 15 cm) and two open arms (OA, 30 × 5 cm) forming a square cross with a 5 × 5 cm square centerpiece and elevated 40 above the floor. The animals were placed in the center of the plus-maze facing one of the EA and observed for 5 min. No genotype differences were found in the percentage of time spent in the OA, nor the number of entries (four paws criteria) into each arm. (C) *White-black box*: equal latency to leave the black compartment (no light, 270 × 180 × 270 mm) and through an opening (70 × 70 mm) thereby entering the white compartment (red light, 20 lux, 270 × 270 × 270 mm) was observed in 3 × TgAD mice. Time spent in the white area was longer in 3 × TgAD than in NTg animals (Student's *t*-test, * $P < 0.05$). (D) *Boissier's 16 hole-board test*: Similar exploratory behavior was recorded in this test for both genotypes (brown woodwork, 60 × 60 × 40 cm, 16 holes, 20 lux). Interestingly, the number of defecation boli were observed to be increased in 3 × TgAD, as compared to NTg mice, in all of these tests (see Table 4).

the distinction of protected peripheral areas in the apparatus could be behind the contradictory results. This interpretation is in agreement with results obtained in

3 × TgAD mice of different ages assessed in a battery of behavioral tests (see Figs. 5–9). From 2.5 months of age onward a consistent reduction in exploratory behavior is

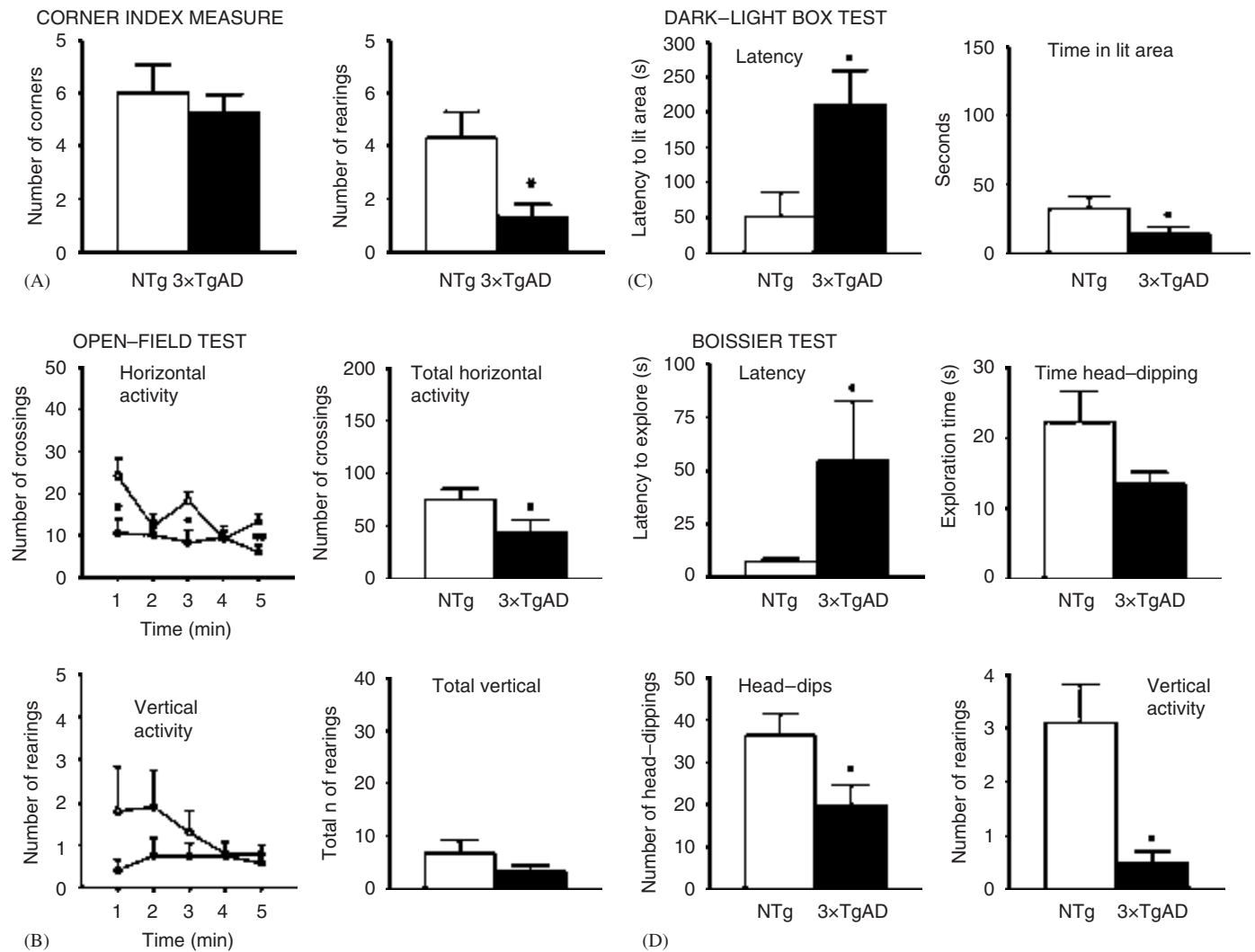


Fig. 9. BPSD-like disturbances in 12 month-old 3 × TgAD female mice. *Subjects:* See legend Table 1. *Experiment 3, Behavioral analysis and Results:* After assessment of learning and memory in several paradigms in the MWM (Figs. 3 and 4) the set of 12-month-old 3 × TgAD (black bars or 3 × TgAD, $n = 12$) and non-transgenic mice (white bars or NTg, $n = 10$) was successively confronted with a series of tests to evaluate “behavioral and psychological symptoms of dementia”. (A) In the first test, animals were individually assessed for *neophobia to a new home cage*. The animals were gently placed in the center of a standard macrolon cage ($35 \times 35 \times 25$ cm, 20 lux) containing bedding. The number of corners visited and rearings were recorded during 30 s. Although a similar number of visits was found in both groups of animals, 3 × TgAD mice showed reduced exploratory behavior (rearings, Student’s t -test, $*P < 0.05$). (B) *Open-field*: Initial freezing behavior was observed when 3 × TgAD animals were placed in the center of the apparatus (white woodwork, $55 \times 55 \times 25$ cm high, 20 lux) and observed for 5 min (see Table 4). In contrast, the presence of freezing behavior was rare in NTg mice. A statistically significant lower number of crossings was recorded during the first, third and fifth minute of the test, leading to reduced total horizontal activity in old 3 × TgAD mice as compared to old NTg mice (Student’s t -test, $*P < 0.05$). No differences were found in vertical activity although the analysis of the temporal activity curves showed a trend toward sustained low rearing behavior in 3 × TgAD as compared to NTg mice. No differences were found in defecation but a higher presence of urine was seen (Fisher exact test = 3.281, 1 df, $P = 0.040$). *Plus maze* (not illustrated): The apparatus (black woodwork, 20 lux) consisted of two enclosed arms (EA, $30 \times 5 \times 15$ cm) and two open arms (OA; 30×5 cm) forming a square cross with a 5×5 cm square centerpiece and elevated 40 above the floor. The animals were placed in the center of the plus-maze facing one of the EA and observed for 5 min. No genotype differences were found in the percentage of time spent in the OA, nor the number of entries (four paws criteria) into each arm. (C) *Dark-light box*: Increased latency to leave the dark compartment (black, no light, $270 \times 180 \times 270$ mm) and through an opening (70×70 mm) thereby entering the lit compartment (white, 20W, $270 \times 270 \times 270$ mm) was observed in 3 × TgAD mice. Once there, the time spent in the lit area was also shorter in 3 × TgAD than in NTg animals (All Student’s t -test, $*P < 0.05$). (D) Exploratory behavior in the *Boissier’s 16-holeboard* (brown woodwork, $60 \times 60 \times 40$ cm, 16 holes, 20 lux) was reduced in 3 × TgAD mice as revealed by a longer latency to explore, a reduced number of head-dippings and decreased rearing behavior. A trend toward reduced total time in head-dipping behavior and increased defecation were noted, albeit not reaching statistical significance. Urination was also observed in this test (see Table 4) but there were no genotype differences. After these tests, sensorimotor tasks and spontaneous activity for 5 min and 1 h were studied (see Table 3 and Fig. 6).

observed in 3 × TgAD, as compared to non-transgenic controls, when assessed in an open-field test (see initial freezing in Table 3, crossings and/or rearings in Figs. 7A, 8A and 9B). Also at older ages, the corner test (similar activity but reduced number of rearings, see Fig. 9A) and the Boissier 16-hole-board test (reduced rearings and head-dippings as well as increased latency to explore, see Fig. 9D) show reduced interest and novelty-seeking behavior in novel and mildly stressful enclosures. When spontaneous activity is evaluated in a less stressful environment (i.e. a new standard home cage) reduced rearing behavior is mainly restricted to elderly mice (Fig. 6A) but improves with time in the enclosure and turns into increased activity (Fig. 6B), therefore suggesting that changes and deficits in activity are also highly dependent on the anxiety-like behavior induced by the test itself. In fact, changes in novelty-induced exploratory behaviors may be modified by anxiolytic and anxiogenic compounds (Crawley et al., 1997). This interpretation would be congruent with the area-dependent (peripheral) hyperactivity proposed by Lalonde et al., (2003a, b).

Some patients with AD exhibit disinhibition expressed with socially unacceptable behaviors and inappropriate euphoria (Chung and Cummings, 2000) that may find its parallel in disinhibited behavior in the plus maze test (increased entries and time spent in open arms) reported for β APP₆₉₅SWE and *PSI/A246E* mice (Lalonde et al., 2003a, b). Interestingly, evidence for a relationship between cage stereotypes, such as those mentioned above for β APP₇₅₁SWE and TgCRN8 mice, and behavioral disinhibition in laboratory rodents has already been reported (Garner and Mason, 2002). In this way, diminished stereotyped responses were observed in β APP₇₅₁SWE mice during exposure to novel stimuli such as an open field, etc (Lalonde et al., 2002). However, the anxious-like behavior of other transgenic models expressing the human wild type (β APP₇₅₁, Moran et al., 1995), the same mutation (β APP₇₅₁SWE, Lalonde et al., 2002), double-transgenics (β APP₆₉₅SWE + *PSI-M146L*, Arendash et al., 2001) did not differ from that of their respective controls and, in some cases (β APP₆₉₅SWE/humo + *PSI/A246E*), it may have even been increased. Conversely Tg-APP(Sw, V717F)/

Table 3
Somatic growth, sensorimotor function and circadian activity in 12 month-old 3 × TgAD female mice

Experiment 3	12 months old	
	Non-transgenic	3 × TgAD
	<i>n</i> = 10	<i>n</i> = 9
(A) Somatic growth		
Weight (g)	30.2 ± 1.5	36.7 ± 2.1*
(B) Sensorimotor function		
<i>Wood rod test (two 20-s trials)</i>		
Balance (total falling latency, s)	40 ± 0.0	39.8 ± 0.2 n.s.
Coordination (total distance, cm)	7 ± 1.5	2.3 ± 0.9*
<i>Wire rod test (two 20-s trials)</i>		
Balance (total falling latency, s)	15.9 ± 2.1	16.2 ± 3.1 n.s.
Coordination (total distance, cm)	3.5 ± 2.1	0 ± 0.0 n.s.#.
<i>Wire hang test (two 5-s trials)</i>		
Strength (total time hold, s)	9.1 ± 0.6	9.7 ± 0.2 n.s.
Coordination (total distance, segments)	1.8 ± 0.3	2 ± 0.6 n.s.
<i>Wire hang test (one 60-s trial)</i>		
Resistance (time hold, s)	45.3 ± 6.8	42.3 ± 5.7 n.s.
Motor coordination (Distance, segments)	3 ± 0.6	3.5 ± 0.9 n.s.
(C) Spontaneous activity		
Horizontal activity—5 min	See Fig. 6A*	
Vertical activity—5 min	See Fig. 6A*	
Horizontal activity—1 h	See Fig. 6B*	
Vertical activity—1 h	See Fig. 6B	

Subjects: See legend Table 1. **Experiment 3:** In this experiment, one set of 12 month-old 3 × TgAD and NTg female mice was behaviorally assessed in a series of tests (Figs. 3, 4 and 9) and thereafter evaluated for sensorimotor function and spontaneous activity. At this age, both A β plaques and early stages of tau pathology (mislocation of tau) have been described in 3 × TgAD mice (Oddo et al., 2003a, b). **Results:** Results are means ± SEM. (A) As observed in 6-month-old male transgenic mice (see Table 2), increased body weight was also recorded in 12-month-old 3 × TgAD females when compared to age- and sex-matched NTg animals. (B) Sensorimotor disturbances were observed in 3 × TgAD mice as reduced (Student's *t*-test, **P* < 0.05) or null (#, a trend) distance covered on the wood and wire rod tests, respectively. Similar strength and motor coordination were shown in both consecutive short 5-s trials and the third long 60-s trial (see *Behavioral analysis* in Table 1) (C) Four mice per day (2 of each genotype) were individually tested for 1 h (beginning at 08:30 h) in a multicage photocell activity meter system (Panlab, S.L., Barcelona, Spain). Testing cages (Plexiglass, 40 × 40 × 40 cm) were similar to the home cage and contained clean sawdust. The first 5 min of the test were analyzed as initial spontaneous activity developed in the cage (see Fig. 6).

B6 mice, designed to eliminate the potential phenotypic variations attributed to compound genetic backgrounds, displayed progressive learning and memory deficits and severely increased anxiety, and that at ages with an absence of visible plaque deposition. Moreover, altered expression of genes previously implicated in anxiety has been found in the amygdala of these transgenic animals (Lee et al., 2004). These data suggest that such a behavior is either difficult to model or maybe even to measure. In this respect, in adult pre-plaque $3 \times$ TgAD mice (6 months old) the black and white box test was more sensitive than the plus maze test, and the same animals exhibited disinhibitory behavior,

measured as an increased exploration of the white area (increased time and number of entries, see Fig. 8C and legend). However, it is important to note that when $3 \times$ TgAD aged mice were exposed to a more anxiogenic situation in this double enclosure by lighting the white area (see Fig. 9C), enhanced aversive behavior was seen in both $3 \times$ TgAD and control animals, although the aversion was more intense in the former group. Also, increased emotionality was observed in adult and old $3 \times$ TgAD as measured by initial freezing behavior, as well as increased defecation and urination in most of the tests (see Table 4), also suggesting that an induction of changes in the

Table 4
Emotionality in 2.5- and 6-month-old $3 \times$ TgAD male mice

A. Experiment 2	2.5 months old		6 months old	
	Non-transgenic	$3 \times$ TgAD	Non-transgenic	$3 \times$ TgAD
1. Defecation boli	$n = 13$	$n = 13$	$n = 13$	$n = 13$
(A) In the open-field	1.5 ± 0.5	$3.8 \pm 0.7^*$	2 ± 0.5	$3.8 \pm 0.5^*$
(B) In the plus maze	1.5 ± 0.5	2.7 ± 0.6 n.s.	0.9 ± 0.3	$2.7 \pm 0.4^{**}$
(C) In the black-white box	0.9 ± 0.4	$2.5 \pm 0.5^*$	1.1 ± 0.4	$2.8 \pm 0.5^*$
(D) In the Boissier's board	0.5 ± 0.3	1.8 ± 0.6 n.s.	0.8 ± 0.4	$2.6 \pm 0.5^*$
B. Experiment 3	12 month-old			
	Non-transgenic	$3 \times$ TgAD		
	$n = 10$	$n = 12$		
1. Initial freezing				
(A) In the open-field				
Latency to move (s)	2.0 ± 0.8	$6.3 \pm 1.1^{**}$		
(B) In the plus-maze				
Latency to move (s)	2.6 ± 1.8	$9.1 \pm 3.92^{**}$		
(C) In the dark-light box	Not available due to darkness			
(D) In the Boissier's board				
Latency to move (s)	see Fig. 9D*			
2. Defecation boli				
(A) In the open-field	1.9 ± 0.3	2.8 ± 0.5 n.s.		
(B) In the plus maze	0.9 ± 0.3	1.4 ± 0.3 n.s.		
(C) In the dark-light box	2.5 ± 0.8	3.3 ± 0.8 n.s.		
(D) In the Boissier's board	1.0 ± 0.3	$3.5 \pm 0.4^{***}$		
3. Urination (incidence)				
(A) In the open-field	0/10	5/12	Fisher exact test*	
(B) In the plus maze	0/10	0/12	Fisher exact test, n.s.	
(C) In the dark-light box	3/10	1/12	Fisher exact test, n.s.	
(D) In the Boissier's board	0/10	0/10	Fisher exact test, n.s.	

Subjects: See legend Table 1. **Experiment 2:** In this experiment, a second set of adult (2.5 and 6 month old) $3 \times$ TgAD and NTg male mice (different from that studied on Experiment 1) was behaviorally evaluated in a series of tests (Figs. 1, 2, 7 and 8). At 2.5 months of age absence of A β intra- and extracellular immunoreactivity (IR) has been described in $3 \times$ TgAD, while at 6 months presence of intraneuronal A β IR and hippocampal synaptic deficits on LTP were reported in $3 \times$ TgAD as compared to age-matched NTg mice (Oddo et al., 2003a). **Experiment 3:** In this experiment, the behavior of one set of old (12 months of age) $3 \times$ TgAD and NTg female mice was studied in a series of tests (this table; Figs. 3, 4 and 9) and thereafter evaluated for sensorimotor function and spontaneous activity (see Table 3). At this age, both A β plaques and early stages of tau pathology (mislocation of tau) have been described in $3 \times$ TgAD (Oddo et al. (2003a, b)). **Results:** Variables related to emotionality in some of the tests for "behavioral and psychological symptoms of dementia" (BPSD, Figs. 7–9) are presented here. Results are means \pm SEM. (A) Increased defecation was observed in all the tests in $3 \times$ TgAD mice at 2.5 and 6 months of age, although not reaching statistical significance in the plus maze and Boissier's board at the youngest age. (B) At 12 months of age, initial freezing behavior was observed in $3 \times$ TgAD mice immediately after being placed in the open-field and Boissier's apparatus. Increased defecation was observed during all the tests in $3 \times$ TgAD mice, albeit only reaching statistical significance compared to the NTg animals in the open-field and Boissier's tests. Presence of urination was observed in two tests, with higher incidence in the $3 \times$ TgAD group in the open-field test. Statistics: Student's *t*-test or as otherwise indicated. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

emotional phenotype of transgenic animals for AD can occur prior to the appearance of extracellular A β deposits.

5. Concluding remarks

Although modeling the behavioral and neuronal symptoms of AD in mice has been very challenging, efforts to reproduce the hallmarks of the disease have experienced great advances during recent years. Some neuronal phenotypes however, such as synaptic dysfunction or synaptic loss, have been scarcely mimicked and most of the animal models may have poor predictive value in evaluating the complete array of effects of preventive or therapeutic strategies, as they have mainly focused on one of the two pathologies (extracellular A β plaque). The gap between the clinical features of this progressive disease and their induction in animal models is getting shorter, but some behaviors which are specifically human will be difficult to replicate. This is also the case for neuropsychiatric symptoms of dementia, which have just been started to be addressed in some of these models.

We have presented here evidence for the pathogenic role of intraneuronal A β in AD (and DS), and described how this early event relates to other neuropathological aspects of the disease and, especially, to cognitive deficits. Reviewing the recent literature in the light of new data available on cognitive and BPSD-like changes in pre-pathologic 3 \times TgAD mice, it seems that intraneuronal A β is an early, pathogenic biomarker for the onset of AD-relevant cognitive deterioration prior to the overt neuropathological lesions which may contribute to late-stage cognitive deficits. It is not clear, however, which aggregation state or form of intraneuronal A β induces this effect, and whether intracellular A β serves as a source for extracellular A β that exists in diffuse and neuritic plaques. Further directions of research should approach the mechanisms of action of the pathophysiological contribution of intracellular A β in AD, and try to determine how extensive plaque, as well as tangle, pathology may contribute to late-stage cognitive deficits, and to which extent cognitive stimulation (environmental enrichment) is able to improve both cognitive and pathological phenotypes, as studies with experienced (retested) 3 \times Tg-AD mice have suggested.

Acknowledgments

This work was supported by grants from SAF2003-03480 to L. G-LL, G. B, T. C, A. T and A. F-T.; Ramon y Cajal Program, UAB-140267, EME2006-140335 to L. G-LL; Alzheimer Fund (Sweden) and the Åhlén, Ericsson, Johansson and Stohne foundations to B.J.; the NIA (AG0212982) and the Alzheimer's Association to S.O. and F.M.L.

References

- Álvarez, A., Toro, R., Caceres, A., Maccioni, R.B., 1999. Inhibition of tau phosphorylating protein kinase cdk5 prevents beta-amyloid-induced neuronal death. *FEBS Letters* 459, 421–426.
- Ambrée, O., Touma, C., Görtz, N., Keyvani, K., Paulus, W., Palme, R., Sachser, N., 2006. Activity changes and marked stereotyped behavior precede Ab pathology in TgCRND8 Alzheimer mice. *Neurobiological Aging* 27, 955–964.
- Ancoli-Israel, S., Parker, L., Sinaee, R., Fell, R.L., Kripke, D.F., 1989. Sleep fragmentation in patients from a nursing home. *Journal of Gerontology* 44, M18–M21.
- Arendash, G.W., King, D.L., Gordon, M.N., Morgan, D., Hatcher, J.M., Hope, C.E., Diamond, D.M., 2001. Progressive, age-related behavioral impairments in transgenic mice carrying both mutant amyloid precursor protein and presenilin-1 transgenes. *Brain Research* 891, 42–53.
- Arendash, G.W., Lewis, J., Leighty, R.E., McGowan, E., Cracchiolo, J.R., Hutton, M., Garcia, M.F., 2004. Multi-metric behavioral comparison of APPsw and P301L models for Alzheimer's disease: linkage of poorer cognitive performance to tau pathology in forebrain. *Brain Research* 1012, 29–41.
- Arriagada, P.V., Growdon, J.H., Hedley-Whyte, E.T., Hyman, B.T., 1992. Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. *Neurology* 42, 631–639.
- Artero, S., Tierney, M.C., Touchon, J., Ritchie, K., 2003. Prediction of transition from cognitive impairment to senile dementia: a prospective, longitudinal study. *Acta Psychiatrica Scandinavica* 107, 390–393.
- Ashe, K.H., 2001. Learning and memory in transgenic mice modeling Alzheimer's disease. *Learning Memory* 8, 301–308.
- Askanas, V., Álvarez, R.B., Engel, W.K., 1993. Beta-Amyloid precursor epitopes in muscle fibers of inclusion body myositis. *Annali di Neurologica* 34, 551–560.
- Auld, D.S., Kornecook, T.J., Bastianetto, S., Quirion, R., 2002. Alzheimer's disease and the basal forebrain cholinergic system: relations to beta-amyloid peptides, cognition, and treatment strategies. *Progress in Neurobiology* 68, 209–245.
- Bartus, R.T., 2000. On neurodegenerative diseases, models, and treatment strategies: lessons learned and lessons forgotten a generation following the cholinergic hypothesis. *Experimental Neurology* 163, 495–529.
- Bartus, R.T., Dean III, R.L., Beer, B., Lippa, A.S., 1982. The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science* 217, 408–414.
- Bierer, L.M., Haroutunian, V., Gabriel, S., Knott, P.J., Carlin, L.S., Purohit, D.P., Perl, D.P., Schmeidler, J., Kanof, P., Davis, K.L., 1995. Neurochemical correlates of dementia severity in Alzheimer's disease: relative importance of the cholinergic deficits. *Journal of Neurochemistry* 64, 749–760.
- Billings, L., Oddo, S., Green, K.N., McGaugh, J.L., LaFerla, F.M., 2005. Intraneuronal A β causes the onset of early Alzheimer's disease-related cognitive deficits in transgenic mice. *Neurone* 45, 675–688.
- Bliwise, D.L., 1994. What is sundowning? *Journal of American Geriatric Society* 42, 1009–1011.
- Boncrisiano, S., Calhoun, M.E., Kelly, P.H., Pfeifer, M., Bondolfi, L., Stalder, M., Phinney, A.L., Abramowski, D., Sturchler-Pierrat, C., Enz, A., Sommer, B., Staufenbiel, M., Jucker, M., 2002. Cholinergic changes in the APP23 transgenic mouse model of cerebral amyloidosis. *Journal of Neuroscience* 22, 3234–3243.
- Bronfman, F.C., Moechars, D., van Leuven, F., 2000. Acetylcholinesterase-positive fiber differentiation and cell shrinkage in the septohippocampal pathway of aged amyloid precursor protein London mutant transgenic mice. *Neurobiology Disease* 7, 152–168.
- Busciglio, J., Lorenzo, A., Yeh, J., Yankner, B.A., 1995. Beta-amyloid fibrils induce tau phosphorylation and loss of microtubule binding. *Neurone* 14, 879–888.
- Cabib, S., 1993. Neurobiological basis of stereotypes. In: Lawrence, A.B., Rushen, J. (Eds.), *Stereotypic Animal Behaviour: Fundamentals and Applications to Welfare*. CAB International, Wallingford, pp. 119–146.

- Casas, C., Sergeant, N., Itier, J.M., Blanchard, V., Wirths, O., van der Kolk, N., Vingtdoux, V., van de Steeg, E., Ret, G., Canton, T., Drobecq, H., Clark, A., Bonici, B., Delacourte, A., Benavides, J., Schmitz, C., Tremp, G., Bayer, T.A., Benoit, P., Pradier, L., 2004. Massive CA1/2 neuronal loss with intraneuronal and N-terminal truncated Abeta42 accumulation in a novel Alzheimer transgenic model. *American Journal of Pathology* 165, 1289–1300.
- Chapman, P.F., White, G.L., Jones, M.W., Cooper-Blacketer, D., Marshall, V.J., Irizarry, M., Younkin, L., Good, M.A., Bliss, T.V., Hyman, B.T., Younkin, S.G., Hsiao, K.K., 1999. Impaired synaptic plasticity and learning in aged amyloid precursor protein transgenic mice. *Natural Neuroscience* 2, 271–276.
- Chen, K.S., Masliah, E., Grajeda, H., Guido, T., Huang, J., Khan, K., Motter, R., Soriano, F., Gmaes, D., 1998. Neurodegenerative Alzheimer-like pathology in PDAPP 717V→F transgenic mice. *Progress in Brain Research* 117, 327–334.
- Chen, G., Chen, K.S., Knox, J., Inglis, J., Bernard, A., Martin, S.J., Justice, A., McConlogue, L., Games, D., Freedman, S.B., Morris, R.G., 2000. A learning deficit related to age and beta-amyloid plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nature* 408, 975–979.
- Chrast, R., Scott, H.S., Madani, R., Huber, L., Wolfer, D.P., Prinz, M., Aguzzi, A., Lipp, H.P., Antonarakis, S.E., 2000. Mice trisomic for a bacterial artificial chromosome with the single-minded 2 gene (Sim2) show phenotypes similar to some of those present in the partial trisomy 16 mouse models of Down syndrome. *Human Molecular Genetics* 9, 1853–1864.
- Chui, D.H., Tanahashi, H., Ozawa, K., Ikeda, S., Checler, F., Ueda, O., Suzuki, H., Araki, W., Inoue, H., Shirohata, K., Takahashi, K., Gallyas, F., Tabira, T., 1999. Transgenic mice with Alzheimer presenilin 1 mutations show accelerated neurodegeneration without amyloid plaque formation. *Natural Medicine* 5, 560–564.
- Chung, J.A., Cummings, J.L., 2000. Neurobehavioral and neuropsychiatric symptoms in Alzheimer's disease. *Neurology Clinics* 18, 829–846.
- Crawley, J.N., Belknap, J.K., Collins, A., Crabbe, J.C., Frankel, W., Henderson, N., Hitzemann, R.J., Maxson, S.C., Miner, L.L., Silva, A.J., Wehner, J.M., Wynshaw-Boris, A., Paylor, R., 1997. Behavioral phenotypes of inbred mouse strains: implications and recommendations for molecular studies. *Psychopharmacology* 132, 107–124.
- Cross, A.J., Crow, T.J., Ferrier, I.N., Johnson, J.A., Markakis, D., 1984. Striatal dopamine receptors in Alzheimer-type dementia. *Neuroscience Letters* 52, 1–6.
- Cummings, J.L., Benson, D.F., 1992. *Dementia: A Clinical Approach*. 2nd ed. Butterworth-Heinemann, Boston.
- Cummings, J.L., Vinters, H.V., Cole, G.M., Khachaturian, Z.S., 1998. Alzheimer's disease: etiologies, pathophysiology, cognitive reserve, and treatment opportunities. *Neurology* 51, S2–S17 Discussion S65–67.
- Cummings, B.J., Su, J.H., Cotman, C.W., White, R., Russell, M.J., 1993. Beta-amyloid accumulation in aged canine brain: a model of early plaque formation in Alzheimer's disease. *Neurobiology Aging* 14, 547–560.
- Daffner, K.R., Scinto, L.F., Weintraub, S., Guinessey, J.E., Mesulam, M.M., 1992. Diminished curiosity in patients with probable Alzheimer's disease as measured by exploratory eye movements. *Neurology* 42, 320–328.
- D'Andrea, M.R., Nagele, R.G., Wang, H.Y., Peterson, P.A., Lee, D.H., 2001. Evidence that neurones accumulating amyloid can undergo lysis to form amyloid plaques in Alzheimer's disease. *Histopathology* 38, 120–134.
- DeKosky, S.T., Scheff, S.W., 1990. Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer's disease: correlation with cognitive severity. *Annali di Neurologia* 27, 457–464.
- D'Hooge, R., Nagels, G., Westland, C.E., Mucke, L., De Deyn, P.P., 1996. Spatial learning deficit in mice expressing human 751-amino acid- B-amyloid precursor protein. *Neuroreport* 7, 2807–2811.
- Dickson, D.W., Crystal, H.A., Bevona, C., Honer, W., Vincent, I., Davies, P., 1995. Correlations of synaptic and pathological markers with cognition of the elderly. *Neurobiology Aging* 16, 285–304.
- Dineley, K.T., Westerman, M., Bui, D., Bell, K., Ashe, K.H., Sweatt, J.D., 2001. Beta-amyloid activates the mitogen-activated protein kinase cascade via hippocampal alpha7 nicotinic acetylcholine receptors: in vitro and in vivo mechanisms related to Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience* 21, 4125–4133.
- Dineley, K.T., Bell, K.A., Bui, D., Sweatt, J.D., 2002. Beta-amyloid peptide activates alpha 7 nicotinic acetylcholine receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Journal of Biological Chemistry* 277, 25056–25061.
- Dodart, J.C., Mathis, C., Saura, J., Bales, K.R., Paul, S.M., Ungerer, A., 2000. Neuroanatomical abnormalities in behaviorally characterized APP(V717F) transgenic mice. *Neurobiology Disease* 7, 71–85.
- Dodart, J.C., Mathis, C., Bales, K.R., Paul, S.M., 2002. Does my mouse have Alzheimer's disease? *Genes Brain Behavior* 1, 142–155.
- Feng, Z., Chang, Y., Cheng, Y., Zhang, B.L., Qu, Z.W., Qin, C., Zhang, J.T., 2004. Melatonin alleviates behavioral deficits associated with apoptosis and cholinergic system dysfunction in the APP 695 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of Pineal Research* 37, 129–136.
- Flood, D.G., Coleman, P.D., 1990. Hippocampal plasticity in normal aging and decreased plasticity in Alzheimer's disease. *Progress in Brain Research* 83, 435–443.
- Garner, J.P., Mason, G.J., 2002. Evidence for a relationship between cage stereotypes and behavioral disinhibition in laboratory rodents. *Behavior of Brain Research* 136, 83–92.
- Gil-Bea, F.J., Garcia-Alloza, M., Dominguez, J., Marcos, B., Ramirez, M.J., 2005. Evaluation of cholinergic markers in Alzheimer's disease in a model of cholinergic deficit. *Neuroscience Letters* 375, 37–41.
- Giménez-Llort, L., Fernández-Teruel, A., Escorihuela, R.M., Fredholm, B.B., Tobena, A., Pekny, M., Johansson, B., 2002. Mice lacking the adenosine A1 receptor are anxious and aggressive, but are normal learners with reduced muscle strength and survival rate. *European Journal of Neuroscience* 16, 547–550.
- Giménez-Llort, L., Ferré, S., Martínez, E., 1995. Effects of the systemic administration of kainic acid and NMDA on exploratory activity in rats. *Pharmacology and Biochemical Behavior* 51, 205–210.
- Giorgi, O., Lecca, D., Piras, G., Driscoll, P., Corda, M.G., 2003. Dissociation between mesocortical dopamine release and fear-related behaviours in two psychogenetically selected lines of rats that differ in coping strategies to aversive conditions. *European Journal of Neuroscience* 17, 2716–2726.
- Gouras, G.K., Tsai, J., Naslund, J., Vincent, B., Edgar, M., Checler, F., Greenfield, J.P., Haroutunian, V., Buxbaum, J.D., Xu, H., Greengard, P., Relkin, N.R., 2000. Intraneuronal Abeta42 accumulation in human brain. *American Journal of Pathology* 156, 15–20.
- Graves, L., Pack, A., Abel, T., 2001. Sleep and memory: a molecular perspective. *Trends in Neuroscience* 24, 237–243.
- Greenwood, C.E., Tam, C., Chan, M., Young, K.W., Binns, M.A., van Reekum, R., 2005. Behavioral disturbances, not cognitive deterioration, are associated with altered food selection in seniors with Alzheimer's disease. *Journal of Gerontology A. Biological Science and Medical Science* 60, 499–505.
- Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., George, L., Tung, Y.C., Kim, K.S., Wisniewski, H.M., 1989. Amyloid protein and neurofibrillary tangles coexist in the same neuron in Alzheimer disease. *Proceedings of National Academy of Science USA* 86, 2853–2857.
- Gsell, W., Jungkunz, G., Riederer, P., 2004. Functional neurochemistry of Alzheimer's disease. *Current Pharmaceutical Disease* 10, 265–293.
- Gyure, K.A., Durham, R., Stewart, W.F., Smialek, J.E., Troncoso, J.C., 2001. Intraneuronal abeta-amyloid precedes development of amyloid plaques in Down syndrome. *Archives of Pathology Laboratory Medicine* 125, 489–492.
- Hardy, J., Selkoe, D.J., 2002. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297, 353–356.
- Harper, D.G., Stopa, E.G., McKee, A.C., Satlin, A., Fish, D., Volicer, L., 2004. Dementia severity and lewy bodies affect circadian rhythms in Alzheimer's disease. *Neurobiological Aging* 25, 771–781.

- Hatzinger, M., Z'Brun, A., Hemmeter, U., Seifritz, E., Baumann, F., Holsboer-Tachler, E., Heuser, I.J., 1995. Hypotaholamic–pituitary–adrenal system function inpatients with Alzheimer's disease. *Neurobiology Aging* 16, 205–209.
- Hellstrom-Lindahl, E., Moore, H., Nordberg, A., 2000. Increased levels of tau protein in SH-SY5Y cells after treatment with cholinesterase inhibitors and nicotinic agonists. *Journal of Neurochemistry* 74, 777–784.
- Hellstrom-Lindahl, E., Court, J., Keverne, J., Svedberg, M., Lee, M., Marutle, A., Thomas, A., Perry, E., Bednar, I., Nordberg, A., 2004. Nicotine reduces A β in the brain and cerebral vessels of APPsw mice. *European Journal of Neuroscience* 19, 2703–2710.
- Higgins, G.A., Jacobsen, H., 2003. Transgenic mouse models of Alzheimer's disease: phenotype and application. *Behavior Pharmacology* 14, 419–438.
- Hock Jr., B.J., Lamb, B.T., 2001. Transgenic models of Alzheimer's disease. *Trends Genetics* 17, S7–S12.
- Holcomb, L.A., Gordon, M.N., Jantzen, P., Hsiao, K., Duff, K., Morgan, D., 1999. Behavioral changes in transgenic mice expressing both amyloid precursor protein and presenilin-1 mutations: lack of association with amyloid deposits. *Behavior Genetics* 29, 177–185.
- Hope, T., Keene, J., Gedling, K., Fairburn, C.G., Jacoby, R., 1998. Predictors of institutionalization for people with dementia living at home with a care. *International Journal of Geriatric Psychiatry* 13, 682–690.
- Hsiao, K.K., Borchelt, D.R., Olson, K., Johannsdottir, R., Kitt, C., Yunis, W., Xu, S., Eckman, C., Younkin, S., Price, D., Iadecola, C., Clark, H.B., Carlson, G., 1995. Age-related CNS disorder and early death in transgenic FVB/N mice overexpressing Alzheimer amyloid precursor proteins. *Neuron* 15, 1203–1218.
- Hsiao, K., Chapman, P., Nilsen, S., Eckman, C., Harigaya, Y., Younkin, S., Yang, F.S., Cole, G., 1996. Correlative memory deficits, a-beta elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science* 274, 99–102.
- Huitrón-Reséndiz, S., Sánchez-Álvarez, M., Gallegos, R., Berg, G., Crawford, E., Giacchino, J.L., Games, D., Henriksen, S.J., Criado, J.R., 2002. Age-independent and age-related deficits in visuospatial learning, sleep-wake states, thermoregulation and motor activity in PDAPP mice. *Brain Research* 928, 126–137.
- Huitrón-Reséndiz, S., Sánchez-Álvarez, M., Criado, J.R., 2005. Sleep-wake states in transgenic mouse models overexpressing the human beta-amyloid precursor protein. *American Journal of Alzheimer's Disease and Other Dementia* 20, 87–90.
- Hwang, T.J., Masterman, D.L., Ortiz, F., Fairbanks, L.A., Cummings, J.L., 2004. Mild cognitive impairment is associated with characteristic neuropsychiatric symptoms. *Alzheimer Disease Association for Disorder* 18, 17–21.
- Janus, C., Westaway, D., 2001. Transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *Physiology Behavior* 73, 873–886.
- Janus, C., Chishti, M.A., Westaway, D., 2000. Transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *Biochimica Biophysica Acta* 1502, 63–75.
- Joyce, J.N., Murray, A.M., Hurtig, H.I., Gottlieb, G.L., Trojanowski, J.Q., 1998. Loss of dopamine D2 receptors in Alzheimer's disease with parkinsonism but not Parkinson's or Alzheimer's disease. *Neuropsychopharmacology* 19, 472–480.
- Jucker, M., Ingram, D.K., 1997. Murine models of brain aging and age-related neurodegenerative diseases. *Behavior of Brain Research* 85, 1–25.
- Kar, S., Slowikowski, S.P., Westaway, D., Mount, H.T., 2004. Interactions between beta-amyloid and central cholinergic neurons: implications for Alzheimer's disease. *Journal of Psychiatry and Neuroscience* 29, 427–441.
- Kemppainen, N., Ruottinen, H., Nagren, K., Rinne, J.O., 2000. PET shows that striatal dopamine D1 and D2 receptors are differentially affected in AD. *Neurology* 55, 205–209.
- King, D.L., Arendash, G.W., 2002. Maintained synaptophysin immunoreactivity in Tg2576 transgenic mice during aging: correlations with cognitive impairment. *Brain Research* 926, 58–68.
- King, D.L., Arendash, G.W., Crawford, F., Sterk, T., Menendez, J., Mullan, M.J., 1999. Progressive and gender-dependent cognitive impairment in the APPsw transgenic mouse model for Alzheimer's disease. *Behavior of Brain Research* 103, 145–162.
- Kitazawa, M., Oddo, S., Yamasaki, T.R., Green, K.N., LaFerla, F.M., 2005. Lipopolysaccharide-induced inflammation exacerbates tau pathology by a cyclin-dependent kinase 5-mediated pathway in a transgenic model of Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience* 25, 8843–8853.
- LaFerla, F.M., Oddo, S., 2005. Alzheimer's disease: A β , tau and synaptic dysfunction. *Trends in Molecular Medicine* 11, 170–176.
- LaFerla, F.M., Tinkle, B.T., Bieberich, C.J., Haudenschild, C.C., Jay, G., 1995. The Alzheimer's A beta peptide induces neurodegeneration and apoptotic cell death in transgenic mice. *Natural Genetics* 9, 21–30.
- LaFerla, F.M., Hall, C.K., Ngo, L., Jay, G., 1996. Extracellular deposition of beta-amyloid upon p53-dependent neuronal cell death in transgenic mice. *Journal of Clinical Investigation* 98, 1626–1632.
- LaFerla, F.M., Troncoso, J.C., Strickland, D.K., Kawas, C.H., Jay, G., 1997. Neuronal cell death in Alzheimer's disease correlates with apoE uptake and intracellular Abeta stabilization. *Journal of Clinical Investigation* 100, 310–320.
- Lai, F., Williams, R.S., 1989. A prospective study of Alzheimer disease in Down Syndrome. *Archives of Neurology* 46, 849–853.
- Lalonde, R., Dumont, M., Sturchler-Pierrat, C., Staufenbiel, M., Strazielle, C., 2002. Spatial learning, exploration, anxiety, and motor coordination in female APP23 transgenic mice with the Swedish mutation. *Brain Research* 956, 36–44.
- Lalonde, R., Lewis, T.L., Strazielle, C., Kim, H., Fukuchi, K., 2003a. Transgenic mice expressing the betaAPP695SWE mutation: effects on exploratory activity, anxiety, and motor coordination. *Brain Research* 977, 38–45.
- Lalonde, R., Qian, S., Strazielle, C., 2003b. Transgenic mice expressing the PS1-A246E mutation: effects on spatial learning, exploration, anxiety and motor coordination. *Behavior of Brain Research* 138, 71–79.
- Lee, K.W., Lee, S.H., Kim, H., Song, J.S., Yang, S.D., Paik, S.G., Han, P.L., 2004. Progressive cognitive impairment and anxiety induction in the absence of plaque deposition in C57BL/6 inbred mice expressing transgenic amyloid precursor protein. *Journal of Neuroscience Research* 76, 572–580.
- Leighty, R.E., Nilsson, L.N., Potter, H., Costa, D.A., Low, M.A., Bales, K.R., Paul, S.M., Arendash, G.W., 2004. Use of multimetric statistical analysis to characterize and discriminate between the performance of four Alzheimer's transgenic mouse lines differing in A β deposition. *Behavior of Brain Research* 153, 107–121.
- Maeda, K., Tanimoto, K., Terada, T., Shintani, T., Kakigi, T., 1991. Elevated urinary free cortisol in patients with dementia. *Neurobiology Aging* 12, 161–163.
- Magrane, J., Smith, R.C., Walsh, K., Querfurth, H.W., 2004. Heat shock protein 70 participates in the neuroprotective response to intracellularly expressed beta-amyloid in neurons. *Journal of Neuroscience* 24, 1700–1706.
- Martin, L.J., Pardo, C.A., Cork, L.C., Price, D.L., 1994. Synaptic pathology and glial responses to neuronal injury precede the formation of senile plaques and amyloid deposits in the aging cerebral cortex. *American Journal of Pathology* 145, 1358–1381.
- Masliah, E., Rockenstein, E., 2000. Genetically altered transgenic models of Alzheimer's disease. *Journal of Neurology Transmission Supplementary* 59, 175–183.
- Masliah, E., Mallory, M., Alford, M., DeTeresa, R., Hansen, L.A., McKeel Jr., D.W., Morris, J.C., 2001. Altered expression of synaptic proteins occurs early during progression of Alzheimer's disease. *Neurology* 56, 127–129.
- Mason, G.J., 1991. Stereotypes: a critical review. *Animal Behavior* 41, 1015–1037.
- Mattson, M.P., 2004. Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature* 430, 631–639.

- McDonald, M.P., Overmier, J.B., 1998. Present imperfect: a critical review of animal models of the mnemonic impairments in Alzheimer's disease. *Neuroscience Biobehavior Review* 22, 99–120.
- McKee, A.C., Kosik, K.S., Kowall, N.W., 1991. Neuritic pathology and dementia in Alzheimer's disease. *Annali di Neurologica* 30, 156–165.
- Mendell, J.R., Sahenk, Z., Gales, T., Paul, L., 1991. Amyloid filaments in inclusion body myositis. Novel findings provide insight into nature of filaments. *Archives of Neurology* 48, 1229–1234.
- Mirakhor, A., Craig, D., Hart, D.J., McLlroy, S.P., Passmore, A.P., 2004. Behavioural and psychological syndromes in Alzheimer's disease. *International Journal of Geriatric Psychiatry* 19, 1035–1039.
- Mochizuki, A., Tamaoka, A., Shimohata, A., Komatsuzaki, Y., Shoji, S., 2000. Abeta42-positive non-pyramidal neurons around amyloid plaques in Alzheimer's disease. *Lancet* 355, 42–43.
- Moechars, D., Dewachter, I., Lorent, K., Reverse, D., Baekelandt, V., Naidu, A., Tesseur, I., Spittaels, K., Haute, C.V., Checler, F., Godaux, E., Cordell, B., van Leuven, F., 1999. Early phenotypic changes in transgenic mice that overexpress different mutants of amyloid precursor protein in brain. *Journal of Biological Chemistry* 274, 6483–6492.
- Moran, P.M., Higgins, L.S., Cordell, B., Moser, P.C., 1995. Age-related learning deficits in transgenic mice expressing the 751-amino acid isoform of human β -amyloid precursor protein. *Proceedings of National Academy of Science USA* 92, 5341–5345.
- Mori, C., Spooner, E.T., Wisniewski, K.E., Wisniewski, T.M., Yamaguchi, H., Saido, T.C., Tolan, D.R., Selkoe, D.J., Lemere, C.A., 2002. Intra-neuronal Abeta42 accumulation in Down syndrome brain. *Amyloid* 9, 88–102.
- Morris, R.G.M., Frey, U., 1997. Hippocampal synaptic plasticity: role in spatial learning or the automatic recording of attended experience? *Philosophical Transactions of Royal Society of London B. Biological Science* 352, 1489–1503.
- Mosconi, L., 2005. Brain glucose metabolism in the early and specific diagnosis of Alzheimer's disease. FDG-PET studies in MCI and AD. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 32, 486–510.
- Mucke, L., Masliah, E., Yu, G.Q., Mallory, M., Rockenstein, E.M., Tatsuno, G., Hu, K., Kholodenko, D., Johnson-Wood, K., McConlogue, L., 2000. High-level neuronal expression of abeta 1-42 inhibits synaptotoxicity without plaque formation. *Journal of Neuroscience* 20, 4050–4058.
- Murphy Jr., G.M., Forno, L.S., Higgins, L., Scardina, J.M., Eng, L.F., Cordell, B., 1994. Development of a monoclonal antibody specific for the COOH-terminal of beta-amyloid 1-42 and its immunohistochemical reactivity in Alzheimer's disease and related disorders. *American Journal of Pathology* 144, 1082–1088.
- Nagele, R.G., D'Andrea, M.R., Anderson, W.J., Wang, H.Y., 2002. Intracellular accumulation of beta-amyloid(1-42) in neurons is facilitated by the alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor in Alzheimer's disease. *Neuroscience* 110, 199–211.
- Nakazawa, K., Sun, L.D., Quirk, M.C., Rondi-Reig, L., Wilson, M.A., Tonegawa, S., 2003. Hippocampal CA3 NMDA receptors are crucial for memory acquisition of one-trial experience. *Neurone* 38, 305–315.
- Nordberg, A., Winblad, B., 1986. Reduced number of [3H]nicotine and [3H]acetylcholine binding sites in the frontal cortex of Alzheimer brains. *Neuroscience Letters* 72, 115–119.
- Nordberg, A., Alafuzoff, I., Winblad, B., 1992. Nicotinic and muscarinic subtypes in the human brain: changes with aging and dementia. *Journal of Neuroscience Research* 31, 103–111.
- Nordberg, A., Hellstrom-Lindahl, E., Lee, M., Johnson, M., Mousavi, M., Hall, R., Perry, E., Bednar, I., Court, J., 2002. Chronic nicotine treatment reduces β -amyloidosis in the brain of a mouse model of Alzheimer's disease (APPsw). *Journal of Neurochemistry* 81, 655–658.
- Oddo, S., Caccamo, A., Shepherd, J.D., Murphy, M.P., Golde, T.E., Kaye, R., Metherate, R., Mattson, M.P., Akbari, Y., LaFerla, F.M., 2003a. Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular $A\beta$ and synaptic dysfunction. *Neurone* 39, 409–421.
- Oddo, S., Caccamo, A., Kitazawa, M., Tseng, B.P., LaFerla, F.M., 2003b. Amyloid deposition precedes tangle formation in a triple transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurobiology Aging* 24, 1063–1070.
- Oddo, S., Billings, L., Kesslak, J.P., Cribbs, D.H., LaFerla, F.M., 2004. $A\beta$ immunotherapy leads to clearance of early, but not late, hyperphosphorylated tau aggregates via the proteasome. *Neurone* 43, 321–332.
- Oddo, S., Caccamo, A., Green, K.N., Liang, K., Tran, L., Chen, Y., Leslie, F.M., LaFerla, F.M., 2005. Chronic nicotine administration exacerbates tau pathology in transgenic model of Alzheimer's disease. *Proceedings of National Academy of Science USA* 102, 3046–3051.
- Okawa, M., Mishima, K., Hishikawa, Y., Hozumi, S., Hori, H., Takahashi, K., 1991. Circadian rhythm disorders in sleep-waking and body temperature in elderly patients with dementia and their treatment. *Sleep* 14, 478–485.
- Pani, L., Porcella, A., Gessa, G.L., 2000. The role of stress in the pathophysiology of the dopaminergic system. *Molecular Psychiatry* 5, 14–21.
- Pappert, E.J., Goetz, C.G., Stebbins, G.T., Belden, M., Carvey, P.M., 1998. 5-Hydroxytryptophan-induced myoclonus in guinea pigs: mediation through 5-HT1/2 receptor subtypes. *European Journal of Pharmacology* 347, 51–56.
- Pedersen, W.A., Culmsee, C., Ziegler, D., Herman, J.P., Mattson, M.P., 1999. Aberrant stress response associated with severe hypoglycemia in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of Molecular Neuroscience* 13, 159–165.
- Perry, G., Cras, P., Siedlak, S.L., Tabaton, M., Kawai, M., 1992. Beta protein immunoreactivity is found in the majority of neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *American Journal of Pathology* 140, 283–290.
- Piccininni, M., Di Carlo, A., Baldereschi, M., Zaccara, G., Inzitari, D., 2005. Behavioral and psychological symptoms in Alzheimer's disease: frequency and relationship with duration and severity of the disease. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 19, 276–281.
- Pizzolato, G., Chierichetti, F., Fabbri, M., Cagnin, A., Dam, M., Ferlin, G., Battistin, L., 1996. Reduced striatal dopamine receptors in Alzheimer's disease: single photon emission tomography study with the D2 tracer [123I]-IBZM. *Neurology* 47, 1065–1068.
- Reisberg, B., Borenstein, J., Salob, S.P., Ferris, S.H., Franssen, E., Georgotas, A., 1987. Behavioral symptoms in Alzheimer's disease phenomenology and treatment. *Journal of Clinical Psychiatry* 48, 9–15.
- Robbins, T.W., 2000. From arousal to cognition: the integrative position of the prefrontal cortex. *Progress in Brain Research* 126, 469–483.
- Robbins, T.W., Everitt, B.J., Marston, H.M., Wilkinson, J., Jones, G.H., Page, K.J., 1989. Comparative effects of ibotenic acid- and quisqualic acid-induced lesions of the substantia innominata on attentional function in the rat: further implications for the role of the cholinergic neurons of the nucleus basalis in cognitive processes. *Behavior of Brain Research* 35, 221–240.
- Roses, A.D., 1994. Apolipoprotein E affects the rate of Alzheimer Disease expression: β -amyloid burden is a secondary consequence dependent on APOE genotype and duration of disease. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 53, 429–437.
- Samuel, W., Terry, R.D., DeTeresa, R., Butters, N., Masliah, E., 1994. Clinical correlates of cortical and nucleus basalis pathology in Alzheimer dementia. *Archives of Neurology* 51, 772–778.
- Sapolsky, R.M., Krey, L.C., McEwen, B.S., 1986. The neuroendocrinology of stress and aging: the glucocorticoid cascade hypothesis. *Endocrine Review* 7, 284–301.
- Satlin, A., Volicer, L., Stopa, E.G., Harper, D., 1995. Circadian locomotor activity and core-body temperature rhythms in Alzheimer's disease. *Neurobiology Aging* 16, 765–771.
- Scheff, S.W., Scott, S.A., DeKosky, S.T., 1991. Quantification of synaptic density in the septal nuclei of young and aged Fischer 344 rats. *Neurobiology Aging* 12, 3–12.
- Seeman, P., Bzowej, N.H., Guan, H.C., Bergeron, C., Reynolds, G.P., Bird, E.D., Riederer, P., Jellinger, K., Tourtellotte, W.W., 1987.

- Human brain D1 and D2 dopamine receptors in schizophrenia, Alzheimer's, Parkinson's, and Huntington's diseases. *Neuropsychopharmacology* 1, 5–15.
- Selkoe, D.J., 1989. The deposition of amyloid proteins in the aging mammalian brain: implications for Alzheimer's disease. *Annals of Medicine* 21, 73–76.
- Selkoe, D.J., 2000. Toward a comprehensive theory for Alzheimer's disease. Hypothesis: Alzheimer's disease is caused by the cerebral accumulation and cytotoxicity of amyloid beta-protein. *Annals of New York Academy of Science* 924, 17–25.
- Selkoe, D.J., 2001. Alzheimer's disease: genes, proteins and therapy. *Physiology Review* 81, 741–766.
- Shie, F.S., LeBoeuf, R.C., Jin, L.W., 2003. Early intraneuronal Abeta deposition in the hippocampus of APP transgenic mice. *Neuroreport* 14, 123–129.
- Shimabukuro, J., Awata, S., Matsuoka, H., 2005. Behavioral and psychological symptoms of dementia characteristic of mild Alzheimer patients. *Psychiatry Clinical Neuroscience* 59, 274–279.
- Shin, I.S., Carter, M., Masterman, D., Fairbanks, L., Cummings, J.L., 2005. Neuropsychiatric symptoms and quality of life in Alzheimer disease. *American Journal of Geriatric Psychiatry* 13, 469–474.
- Smith, C.T., 1985. Sleep states and learning: a review of the animal literature. *Neuroscience Biobehavioral Review* 9, 157–168.
- Spalletta, G., Baldinetti, F., Buccione, I., Fadda, L., Perri, R., Scalmana, S., Serra, L., Caltagirone, C., 2004. Cognition and behaviour are independent and heterogeneous dimensions in Alzheimer's disease. *Journal of Neurology* 251, 688–695.
- Starkstein, S.E., Mizrahi, R., Garau, L., 2005. Specificity of symptoms of depression in Alzheimer disease: a longitudinal analysis. *American Journal of Geriatric Psychiatry* 13, 802–807.
- Steele, R.J., Morris, R.G.M., 1999. Delay-dependent impairment of a matching-to-place task with chronic and intrahippocampal infusion of NMDA-antagonist D-AP5. *Hippocampus* 9, 118–136.
- Sturchler-Pierrat, C., Abramowski, D., Duke, M., Wiederhold, K.H., Mistl, C., Rothacher, S., Ledermann, B., Burki, K., Frey, P., Paganetti, P.A., Waridel, C., Calhoun, M.E., Jucker, M., Probst, A., Stufenbiel, M., Sommer, B., 1997. Two amyloid precursor transgenic mouse models with Alzheimer disease-like pathology. *Proceedings of National Academy of Science USA* 94, 13287–13292.
- Sugaya, K., Giacobini, E., Chiappinelli, V.A., 1990. Nicotinic acetylcholine receptor subtypes in human frontal cortex: changes in Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience Research* 27, 349–359.
- Sze, C.I., Troncoso, J.C., Kawas, C., Mouton, P., Price, D.L., Martin, L.J., 1997. Loss of the presynaptic vesicle protein synaptophysin in hippocampus correlates with cognitive decline in Alzheimer disease. *Journal Neuropathology and Experimental Neurology* 56, 933–944.
- Takahashi, R.H., Milner, T.A., Li, F., Nam, E.E., Edgar, M.A., Yamaguchi, H., Beal, M.F., Xu, H., Greengard, P., Gouras, G.K., 2002. Intraneuronal Alzheimer abeta42 accumulates in multivesicular bodies and is associated with synaptic pathology. *American Journal of Pathology* 161, 1869–1879.
- Takashima, A., Noguchi, K., Sato, K., Hoshino, T., Imahori, K., 1993. Tau protein kinase I is essential for amyloid beta-protein-induced neurotoxicity. *Proceedings of National Academy of Science USA* 90, 7789–7793.
- Tan, L.L., Wong, H.B., Allen, H., 2005. The impact of neuropsychiatric symptoms of dementia on distress in family and professional caregivers in Singapore. *International Psychoger.* 17, 253–263.
- Tanaka, Y., Meguro, K., Yamaguchi, S., Ishii, H., Watanuki, S., Funaki, Y., Yamaguchi, K., Yamadori, A., Iwata, R., Itoh, M., 2003. Decreased striatal D2 receptor density associated with severe behavioral abnormality in Alzheimer's disease. *Annals of Nuclear Medicine* 17, 567–573.
- Terry, R.D., Masliah, E., Salmon, D.P., Butters, N., DeTeresa, R., Hill, R., Hansen, L.A., Katzman, R., 1991. Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synaptic loss is the major correlate of cognitive impairment. *Annali di Neurologica* 30, 572–580.
- Terry Jr., A.V., Buccafusco, J.J., 2003. The cholinergic hypothesis of age and Alzheimer's disease-related cognitive deficits: recent challenges and their implications for novel drug development. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapy* 306, 821–827.
- Theuring, F., Thuncke, M., Kosciessa, U., Turner, J., 1997. Transgenic animals as models of neurodegenerative diseases in humans. *Trends in Biotechnology* 15, 320–325.
- Tomidokoro, Y., Harigaya, Y., Matsubara, E., Ikeda, M., Kawarabayasi, T., Okamoto, K., Shoji, M., 2000. Impaired neurotransmitter systems by Abeta amyloidosis in APPswe transgenic mice overexpressing amyloid beta protein precursor. *Neuroscience Letters* 292, 155–158.
- Touma, C., Ambree, O., Gortz, N., Keyvani, K., Lewejohann, L., Palme, R., Paulus, W., Schwarze-Eicker, K., Sachser, N., 2004. Age- and sex-dependent development of adrenocortical hyperactivity in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiology Aging* 25, 893–904.
- Tseng, B.P., Kitazawa, M., LaFerla, F.M., 2004. Amyloid B-peptide: the inside story. *Current Alzheimer's Research* 1, 231–239.
- van Dam, D., D'Hooge, R., Staufenbiel, M., van Ginneken, C., van Meir, F., De Deyn, P.P., 2003. Age-dependent cognitive decline in the APP23 model precedes amyloid deposition. *European Journal of Neuroscience* 17, 388–396.
- van Someren, E.J., Hagebeuk, E.E., Lijzenga, C., Scheltens, P., de Rooij, S.E., Jonker, C., 1996. Circadian rest-activity rhythm disturbances in Alzheimer's disease. *Biological Psychiatry* 40, 259–270.
- Vitiello, M.V., Bliwise, D.L., Prinz, P.N., 1992. Sleep in Alzheimer's disease and the sundown syndrome. *Neurology* 42, 83–93.
- Vloeberghs, E., van Dam, D., Engelborghs, S., Nagels, G., Staufenbiel, M., De Deyn, P.P., 2004. Altered circadian locomotor activity in APP23 mice: a model for BPSD disturbances. *European Journal of Neuroscience* 20, 2757–2766.
- von Holst, D., 1998. The concept of stress and its relevance for animal behavior. *Advanced Study Behavior* 27, 1–131.
- Wang, H.Y., Lee, D.H., D'Andrea, M.R., Peterson, P.A., Shank, R.P., Reitz, A.B., 2000. Beta-amyloid(1-42) binds to alpha7 nicotinic acetylcholine receptor with high affinity. Implications for Alzheimer's disease pathology. *Journal of Biological Chemistry* 275, 5626–5632.
- Wang, H.Y., Li, W., Benedetti, N.J., Lee, D.H., 2003. Alpha 7 nicotinic acetylcholine receptors mediate beta-amyloid peptide-induced tau protein phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry* 278, 31547–31553.
- Wevers, A., Monteggia, L., Nowacki, S., Bloch, W., Schutz, U., Lindstrom, J., Pereira, E.F., Eisenberg, H., Giacobini, E., de Vos, R.A., 1999. Expression of nicotinic acetylcholine receptor subunits in the cerebral cortex in Alzheimer's disease: histotopographical correlation with amyloid plaques and hyperphosphorylated-tau protein. *European Journal of Neuroscience* 11, 2551–2565.
- Whishaw, I.Q., 1985. Formation of a place learning-set by the rat: a new paradigm for neurobehavioral studies. *Physiology Behavior* 35, 139–143.
- Whitehouse, P.J., Martino, A.M., Antuono, P.G., Lowenstein, P.R., Coyle, J.T., Price, D.L., Kellar, K.J., 1986. Nicotinic acetylcholine binding sites in Alzheimer's disease. *Brain Research* 371, 146–151.
- Wirhings, O., Multhaup, G., Czech, C., Blanchard, V., Moussaoui, S., Tremp, G., Pradier, L., Beyreuther, K., Bayer, T.A., 2001. Intraneuronal Abeta accumulation precedes plaque formation in beta-amyloid precursor protein and presenilin-1 double-transgenic mice. *Neuroscience Letters* 306, 116–120.
- Wong, T.P., Debeir, T., Duff, K., Cuello, A.C., 1999. Reorganization of cholinergic terminals in the cerebral cortex and hippocampus in transgenic mice carrying mutated presenilin-1 and amyloid precursor protein transgenes. *Journal of Neuroscience* 19, 2706–2716.
- Zhang, Y., McLaughlin, R., Goodyer, C., LeBlanc, A., 2002. Selective cytotoxicity of intracellular amyloid beta peptide1-42 through p53 and Bax in cultured primary human neurons. *Journal of Cellular Biology* 156, 519–529.