



TRABAJO DE FIN DE GRADO

GRADO EN MEDICINA

**IMPACTO DE LA ACUMULACIÓN DE BETA
AMILOIDE Y TAU SOBRE LOS DÉFICITS COGNITIVOS
Y SOCIALES EN UN MODELO DE ENFERMEDAD DE
ALZHEIMER**

Autor: Oussama El Ayyane Fahmi

Tutor: Francisco Ros Bernal

Departamento: Unidad Predepartamental de Medicina

Curso 2017/2018

ÍNDICE

.....	1
RESUMEN	3
ABSTRACT	4
EXTENDED SUMMARY	5
1. INTRODUCCIÓN	8
1.1. DEFINICIÓN Y EPIDEMIOLOGÍA	8
1.2. CLÍNICA DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	8
1.3. NEUROANATOMOPATOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	9
1.4. HIPÓTESIS DE LA CASCADA AMILOIDE	9
1.5. HIPÓTESIS DE LA PROTEÍNA TAU	10
1.6. ESTRÉS OXIDATIVO E HIPÓTESIS MITOCONDRIAL EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	11
1.7. HIPÓTESIS INFLAMATORIA EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	11
1.8. PÉRDIDA SINÁPTICA EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	12
1.9. INSULINA Y EA	13
1.10. FACTORES GENÉTICOS EN LA EA	14
1.11. CORRELACIÓN ANATOMOPATOLÓGICA/CLÍNICOPATOLÓGICA	15
1.12. MODELOS ANIMALES PARA LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	16
1.13. OBJETIVOS	17
2. MATERIAL Y MÉTODOS	17
3. RESULTADOS	22
4. DISCUSIÓN	32
4.1. DISCUSIÓN DEL MODELO UTILIZADO	32
4.2. DISCUSIÓN DE LOS DATOS OBTENIDOS	32
5. AGRADECIMIENTOS	36
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36

RESUMEN

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un proceso neurodegenerativo progresivo e irreversible del sistema nervioso central asociado a la edad, que constituye la causa más frecuente de demencia a nivel mundial en personas mayores de 65 años.

Con el objetivo de disponer de un modelo de EA, que reproduzca la patología neuronal y la clínica típica de esta patología, se han caracterizado una gran cantidad de ratones transgénicos. En este trabajo hemos empleado ratones machos mutantes triple transgénico (3xTg-AD) para la enfermedad de Alzheimer (APP^{swe}, PS1M146V y Tau P301L), así como ratones control con genotipo salvaje B6129SF2/J. Como reflejo de lo que se observa en humanos con EA, el ratón 3xTg-AD presenta déficits cognitivos y conductuales, así como presencia de acumulaciones β -amiloide (A β) y tau hiperfosforilada.

El principal objetivo que nos planteamos con este estudio fue dilucidar si en el modelo triple transgénico de EA existían alteraciones cognitivas y de otros síntomas psicológicos (ansiedad), empleando para ellos ratones machos.

Con este fin, se llevaron a cabo diversas pruebas conductuales (prueba del laberinto elevado, prueba de campo abierto y prueba de reconocimiento de objetos) observando un mayor nivel de ansiedad e hipomovilidad en los ratones transgénicos machos.

Palabras clave: *Enfermedad de Alzheimer, β -amiloide, tau hiperfosforilada, cognitivo, conductual, 3xTg-AD.*

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is a progressive and irreversible neurodegenerative process of the central nervous system associated with age, which is the most common cause worldwide dementia in people over 65 years.

In order to have a model of AD, which reproduces the neuronal pathology and the typical symptoms of this pathology, a large number of transgenic mice has been characterized. In this study, we used male mice mutant triple transgenic (3xTg-AD) for Alzheimer's disease (APP^{swe}, PS1M146V and Tau P301L) and control wild genotype B6129SF2 / J. Reflecting what is seen in humans with EA, 3xTg-AD presents cognitive and behavioral deficits, as well as the presence of β -amyloid accumulations ($A\beta$) and hyperphosphorylated tau.

The main objective that we propose with this study is to determine whether the triple transgenic model of AD presents cognitive and other psychological symptoms (anxiety) disorders, using male mice.

For this purpose, several behavioral tests were carried out (elevated plus maze, open field test and object recognition test) observing a higher level of anxiety and hypomotility in male transgenic mice.

Keywords: *Alzheimer's disease, β -amiloide, hyperphosphorylated tau, cognitive, conductual, 3xTg-AD.*

EXTENDED SUMMARY

The main objective that we propose in this study is to define if triple transgenic model of AD presents cognitive and other psychological symptoms disorders, like anxiety, using male mice.

AD is an irreversible progressive neurodegenerative disorder of the central nervous system associated with age, being the most common cause of dementia worldwide in people over 65 years. The number of patients with AD in 2006 was 26.6 million worldwide and the predictions suggest that in 2050 the number of patients will reach 106.8 million.

Memory loss is the clinical symptom most commonly associated with AD, manifesting first as an inability to form and store new memories, followed by a progressive deterioration to recall older memories. Cerebral regions related to memory are affected at the beginning of AD, but the progression of the neurodegenerative process gradually compromises regions related to other cognitive abilities, such as language and motor control.

Neuropathologically, AD is characterized by the loss of cholinergic neurons, the extracellular deposition of β -amyloid protein ($A\beta$) due to the abnormal processing of the amyloid precursor protein (APP), the formation of intracellular neurofibrillary tangles (NFTs) of hyperphosphorylated tau protein, gliosis and loss of neurons. In addition, the extracellular deposition of $A\beta$ and the intracellular formation of the tau tangles play an important role in oxidative stress, excitotoxicity, neuroinflammation and neurotransmitter deficits.

During the last decades, it has been a great challenge to reproduce the neuronal pathology and the behavioral symptomatology of AD in animal models. In order to have an EA model, a large number of transgenic mice have been created and characterized. It has been discovered that mice that overexpressed mutated forms of APP, developed deposits of $A\beta$ in their brain, together with quantifiable memory deficits.

Specifically, to perform our study, we used the 3xTg-AD mouse model since it is the only one that expresses three main genes associated with familial AD (APP^{swe}, PS1M146V and Tau P301L), as well as the corresponding behavioural and neuropathological changes observed in the human form.

For our study, we used 3 male 3xTg-AD mice and 3 male B6129SF2 mice, which were bred in the

animal lab of the Jaume I University in Castellón, from two pairs of parents and mothers acquired commercially (Jackson Laboratories). The mice were housed in a room maintained at 22 ± 2 ° C with a 12:12 light: dark cycle (L: D).

The mice were weaned at 21 days of age and housed in groups of 2-4 littermates in plastic cages (18.75 cm x 28 cm x 12.5 cm), with a PVC tube (4 cm diameter x 7 cm in length) for enrichment. They were provided with food and water ad libitum. When needed, the mice will be genotyped using the polymerase chain reaction (PCR) from tissue samples obtained by ear puncture.

In both groups the tests were performed at 3 months of life of the mice. All tests were ordered from less to more stressful to lessen the effect of stress on learning and memory.

All the behavioural experiments were carried out in an experimental room in which the interference of external sounds and regulated air flow was minimized. The animals were habituated for at least 30 minutes before each test, avoiding any environmental or physical stress that could alter the result of the tests.

Several behavioural tests were carried out (elevated plus maze, open field test and object recognition test). Elevated plus maze is a validated paradigm to evaluate the behaviour associated with anxiety in rodents. It also provides simultaneous measurements of locomotion and exploration.

In addition, another of the behavioural tests that we used was the open-field test, since rodents show a natural aversion to the illuminated open areas. However, they also have an impulse to explore a perceived threatening stimulus. The decrease in anxiety levels leads to greater exploratory behaviour. Increased anxiety will result in less locomotion and a preference to stay close to the walls of the field.

On the other hand, to analyze the different types of specific memory and learning behaviours that allow us to subsequently access cognitive functions in animal models, we use the object recognition test. This test is based on the spontaneous tendency of rodents to explore a new object for longer than a familiar one.

Moreover, all the tests were recorded on video using a video camera (Sony, Canada) and analyzed by a blind observer, who was unaware of the experimental conditions, on a PC computer using the Smart 2.5.19 program.

Furthermore, all analyzes were performed by an observer blinded to the experimental

conditions of the samples. Although the sample size was very low, we performed a simulation of statistical analysis.

Regarding the results, it was shown that 3xTg-AD mutant mice had a hypoactive phenotype that resulted in a lower number of entries in the elevated plus maze, as well as in a lower frequency of head submersions in the elevated plus maze and shorter stays in the open arms, reflecting the anxiety of such mice. Several studies observed that this hypoactivity was also seen in the open-field test, not coinciding with our results that were not significant in this test.

In relation to the object recognition test, several authors have shown in this test, that the mutant mice were deficient in object recognition. In contrast, there were no significant differences in the recognition of objects between the transgenic mice and the control group in our work. Interestingly, 3xTg-AD mice seem to exhibit alterations in the recognition of objects at 9 months, a fact that could explain the absence of significant findings in our study.

The discrepancy between what is observed in the brain with AD compared to mouse models may explain why promising preclinical results do not translate into successful clinical trials.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. DEFINICIÓN Y EPIDEMIOLOGÍA

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un proceso neurodegenerativo progresivo e irreversible del sistema nervioso central (SNC) asociado a la edad, que constituye la causa más frecuente de demencia a nivel mundial en personas mayores de 65 años (50-70% de todos los casos de demencia) (1).

Acorde a las estadísticas del Global Burden Disease Study de la Organización Mundial de la Salud (OMS), la EA se ha convertido en una de las enfermedades con un crecimiento más rápido entre las 50 causas principales de mortalidad en el periodo entre 1990 y 2013 (2) . En consonancia al rápido crecimiento de la población anciana mundial, el número de pacientes con EA también muestra una tendencia creciente año tras año. Según Brookmeyer y cols. en 2006 ,el número de enfermos con EA era de 26,6 millones en todo el mundo y las predicciones apuntan que en 2050 el número de enfermos llegará a 106,8 millones (1 de cada 3 ancianos), de los cuales 16,51 millones serán europeos (3,4).

En contraste, en los últimos datos actualizados hasta la fecha, la prevalencia de la demencia en el año 2009 en España se estimó en unos 600.000 casos, constituyendo la EA un 67% , es decir, cerca de 400.000 de demencia fueron diagnosticados con EA (5).

1.2. CLÍNICA DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

La pérdida de memoria constituye el síntoma clínico más comúnmente asociado con la EA, manifestándose primero como una incapacidad para formar y almacenar nuevos recuerdos, seguida de un deterioro progresivo para recordar recuerdos más antiguos (6). Las regiones cerebrales relacionadas con la memoria se ven afectadas al inicio de la EA, pero la progresión del proceso neurodegenerativo compromete gradualmente las regiones relacionadas con otras capacidades cognitivas, como el lenguaje y el control motor (7).

Además, junto con el deterioro cognitivo clásico y bien conocido, los pacientes con EA también pueden experimentar síntomas no cognitivos importantes relacionados con la autoconciencia y la emotividad, lo que deteriora aún más la calidad de vida, especialmente en etapas tempranas de la enfermedad. Estos síntomas no cognitivos, a menudo denominados síntomas conductuales

y psicológicos de la demencia (SPCD), incluyen trastornos afectivos y psicológicos, (8), siendo los más frecuentes la apatía y la depresión (9,10).

1.3. NEUROANATOMOPATOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Neuropatológicamente la EA se caracteriza por la pérdida de neuronas colinérgicas, el depósito extracelular de proteína β -amiloide ($A\beta$) debido al procesamiento anormal de la proteína precursora amiloide (APP), la formación de ovillos neurofibrilares intracelulares (NFTs, del inglés *Neurofibrillary Tangles*) de proteína tau hiperfosforilada, gliosis y pérdida de neuronas (11,12). Además, las deposiciones extracelulares de $A\beta$ y la formación intracelular de los ovillos tau desempeñan un papel importante en el estrés oxidativo, la excitotoxicidad, la neuroinflamación y los déficits de neurotransmisores (13,14).

Con respecto a la etiología de esta patología, se desconocen la causa o causas que promueven su desarrollo, aunque se han propuesto diferentes hipótesis para explicar el complejo proceso neurodegenerativo subyacente. La mayoría de expertos coinciden en que esta patología se desarrolla como resultado de la presencia de múltiples factores de riesgo modificables y no modificables (edad, sexo, historia familiar, genética, ambiente y estilo de vida) (15).

Actualmente, las hipótesis etiológicas con mayor apoyo entre la comunidad científica son la hipótesis de la cascada amiloide y la hipótesis de la proteína tau fosforilada (16).

1.4 HIPÓTESIS DE LA CASCADA AMILOIDE

La hipótesis de la cascada amiloide formula que el proceso neurodegenerativo observado en los cerebros afectados por EA se deriva fundamentalmente de eventos citotóxicos desencadenados por la formación, agregación y depósitos de $A\beta$. Esta hipótesis ha recibido un amplio apoyo por parte de los investigadores basándose en hallazgos genéticos y estudios de biología molecular en los que pacientes con EA familiar presentaban mutaciones en los genes que codificaban para la proteína precursora de amiloide (APP) (17).

Se ha demostrado que las placas de amiloide, formadas debido a la escisión proteolítica anormal de la APP, desempeñan un papel dominante en la patogénesis de la EA (18). La APP es una proteína de membrana tipo 1 ubicua en todos los tipos neuronales, así como en otros tejidos, con una región citoplasmática corta y un dominio extracelular que se identificó por primera vez en 1987. Esta proteína se sintetiza en el retículo endoplásmico, se transporta a través de vesículas proteicas y se escinde en el complejo de Golgi mediante glicosilación (19). Dentro del

complejo de Golgi, ya sea por α , β - y γ -secretasas, la APP se escinde a través de dos vías metabólicas distintas (20). La proteólisis principal está impulsada por α -secretasa (vía no amiloidogénica), lo que da como resultado la formación de un ectodominio soluble de APP (sAPP α), que puede tener efectos neuroprotectores (19). Mientras que, la escisión proteolítica dependiente de beta y gamma-secretasas de APP (vía amiloidogénica) da lugar a la formación de fragmentos de péptidos A β que varían en longitud de 39 a 43 aminoácidos. Se ha encontrado que estos fragmentos de péptido A β juegan un papel importante en la placa amiloide característica de la patología EA. Los fragmentos que se forman predominantemente son A β 1-40 y A β 1-42 (21).

A β 1-40 es soluble, menos neurotóxico, y se encuentra predominantemente en el cerebro sano, mientras que A β 1-42 es altamente neurotóxico, tiene una mayor propensión a agregarse y se encuentra predominantemente en cerebros con EA. Recientemente, se ha descrito la existencia de A β 1-43, un nuevo producto escindido proteolítico, contribuye potencialmente a la formación de A β (22). Curiosamente, A β 1-43 es altamente amiloidogénico, neurotóxico y se deposita antes que los otros dos productos de escisión (22). Además, también se ha demostrado que los depósitos de péptidos amiloide interactúan con la membrana neuronal, dando como resultado la formación de poros y un influjo excesivo de iones que conducen a la pérdida neuronal y la progresión de la EA (23).

En contraste, actualmente, diversos investigadores plantean que los orígenes de la EA deben revisarse y reconsiderarse por completo, enfatizando en la complejidad y la no linealidad de esta patología (24). Herrup recientemente cuestionó la cascada de A β (25), proponiendo que aunque las placas de A β y la EA están altamente correlacionadas, hay mecanismos moleculares que preceden a la producción de A β , lo que conduce a la EA.

1.5. HIPÓTESIS DE LA PROTEÍNA TAU

En 1907, el papel fundamental de los NFTs en la EA fue postulado por primera vez por Alois Alzheimer, mientras que la correlación entre NFT y EA, y la composición estructural de estos ovillos se caracterizaron en 1968 y 1988 respectivamente (26). Tau es una proteína soluble asociada a microtúbulos, presente en las neuronas que desempeña un rol predominante en el crecimiento axonal y el desarrollo neuronal mediante la estabilización del conjunto microtubular. En condiciones normales, se ha informado que el equilibrio entre la fosfatasa y las quinasas asociadas a microtúbulos mantiene los estados de fosforilación y desfosforilación de tau (27). En condiciones patológicas, la up regulation /regulación al alza de las quinasas y la

down regulation/regulación a la baja de la fosfatasa resultan en hiperfosforilación de la proteína tau que genera filamentos insolubles de doble hélice y ovillos, los ya conocidos como NFTs, que conducen a la degeneración neuronal y la disfunción sináptica. Los NFTs se forman dentro del soma de la neurona durante la progresión de la EA y son complejos proteicos relativamente insolubles que sobreviven incluso después de la muerte de las células neuronales afectadas, donde pueden liberarse extracelularmente. Tras la liberación, estos NFTs extracelulares son recaptados por los astrocitos y las células de microglía (28).

En el cerebro de pacientes con EA, los NFTs se localizan mayoritariamente dentro del hipocampo, la corteza entorrinal, la amígdala, el núcleo dorsal del rafe y el núcleo basal de Meynert (29). Sin embargo, el mecanismo molecular exacto por el cual la deposición de NFT causa disfunción sináptica y muerte neuronal aún no está claro.

1.6. ESTRÉS OXIDATIVO E HIPÓTESIS MITOCONDRIAL EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

La acumulación excesiva de subproductos de la cadena de transporte de electrones en las mitocondrias como radicales de peróxido de hidrógeno, radicales hidroxilo y radicales superóxido (especies reactivas del oxígeno), causan estrés oxidativo y pueden inducir daño celular oxidativo y muerte celular en la EA (30). La creciente evidencia sugiere que las placas de A β interfieren directamente con la cadena de transporte de electrones y producen radicales libres, lo que aumenta el estrés oxidativo (31). Al ser altamente reactivos, algunos de estos radicales superóxido también reaccionan con óxido nítrico, lo que resulta en la formación de radicales peroxinitrito, otra especie oxidativa altamente reactiva. Además de esto, los radicales libres producidos durante la EA podrían conducir a la oxidación y rotura de cadenas de ADN (ácido desoxirribonucleico), entrecruzamiento de proteínas e incluso modificaciones de pares de bases de ADN.

Por otro lado, se ha demostrado que el estrés oxidativo causa oxidación y glicación de ciertas proteínas y lípidos y podría conducir a la formación de productos finales de glicación avanzada, lo que intensifica aún más el estrés oxidativo y la neuroinflamación. Correlacionando con lo anteriormente expuesto, las neuronas presentes en la corteza entorrinal, el hipocampo, la corteza frontal y la amígdala son más propensas a dañarse por estrés oxidativo-nitrosativo y por tanto presentan una mayor progresión de la EA (19).

1.7 HIPÓTESIS INFLAMATORIA EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

A mediados de la década de 1980, se describió por primera vez la correlación entre la EA y la activación de las células de microgliales que intervienen en los procesos neuroinflamatorios (32).

Durante la progresión de la EA, se ha demostrado que las placas amiloideas y los NFT activan la microglía y los astrocitos (33). Además, la activación de la microglía aumenta la expresión de citoquinas proinflamatorias y quimiocinas tales como interleuquina-1 β , interleuquina-6, factor de necrosis tumoral- α e interleucina-8 (34).

Así mismo, los astrocitos activados se unen con los sitios A β y crean varios mediadores proinflamatorios tales como interleuquinas, prostaglandinas, leucotrienos y tromboxanos que aumentan aún más la respuesta neuroinflamatoria (35). Por otro lado, también se ha demostrado que A β estimula la actividad del óxido nítrico, lo que conlleva un aumento de la inflamación y por tanto del daño neuronal. Sin embargo, en los estudios recientes, la inflamación en la EA se ha relacionado con el sistema inmune innato, a diferencia de las enfermedades neuroinflamatorias típicas, como la esclerosis múltiple y las encefalitis con mayor participación del sistema inmune adaptativo (36). Por lo tanto, se precisan mayores estudios sobre los procesos inflamatorios que cursan en la EA de tal manera que se pueda refinar completamente la hipótesis de la cascada inflamatoria.

1.8 PÉRDIDA SINÁPTICA EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Aunque la A β y tau son las dos principales características histopatológicas de la EA, se ha demostrado que las etapas iniciales de la enfermedad comienzan con disfunción sináptica seguida de pérdida neuronal y posteriormente de las alteraciones de A β y tau así como de deterioro cognitivo acusado en etapas avanzadas (37). De igual manera, la pérdida sináptica es una característica consistente que diferencia a las personas dementes de las no dementes y se correlaciona bien con la gravedad de la demencia (38). También se demostró que se relaciona con otros tipos de demencia y con la disminución del rendimiento cognitivo en el envejecimiento cognitivo normal, siendo la característica patológica que mejor se asocia con el deterioro de la función cognitiva en la EA (37,39,40). Asimismo, estudios previos demostraron una disminución del 25-30% en el número de sinapsis en las biopsias corticales frontales y temporales y de 15-35% de pérdida en el número de sinapsis por neurona dentro de los 2-4 años posteriores al inicio de la EA. La mayor pérdida sináptica, sin embargo, ocurre en el hipocampo, donde alcanza entre el 44% y el 55% de la población neuronal. Se cree que la pérdida sináptica se inicia con la degeneración del árbol dendrítico de la corteza entorrinal, ya que representan casi el 90% de las conexiones sinápticas. Paradójicamente, esta pérdida sináptica no solo ocurre en las neuronas degeneradas sino también en las neuronas supervivientes, iniciándose en los estadios iniciales de la EA (41).

Si analizamos los núcleos cerebrales, el hipocampo es el área principal que sufre pérdida

neuronal severa con una atrofia hipocampal que alcanza hasta el 10% por año. Un análisis más detallado mostró que el 50% de las neuronas en el hipocampo se pierden siendo esta pérdida directamente proporcional a la gravedad de la enfermedad. Por lo tanto, muchos estudios sugieren que la progresión y la gravedad de la enfermedad se correlacionan directamente con la pérdida neuronal (42) y la disfunción sináptica, especialmente la disminución en el marcador presináptico, sinaptofisina, y con el aumento en el número de NFT en el hipocampo, corteza entorrinal y cortezas de asociación (40).

En modelos animales de EA, también ha sido demostrado que la pérdida sináptica precede a la acumulación de las placas amiloides y de los ovillos neurofibrilares (43) lo cual confirma que el daño sináptico es un evento temprano.

1.9. INSULINA Y EA

La mayoría de los pacientes con EA son sujetos mayores que comúnmente suelen presentar una variedad de comorbilidades (p.ej. , ictus, diabetes ,osteoporosis y enfermedad renal). La EA, a menudo etiquetada como un trastorno heterogéneo, implica múltiples cascadas de señalización aberrantes en su patogénesis.

Estas comorbilidades parecen añadir complejidad a la patogénesis de la EA, afectando a su inicio y progresión (44). Entre la variedad de comorbilidades, una de las patologías más prevalentes es la diabetes. En este sentido, la resistencia a la insulina es un factor que se ha demostrado que afecta a múltiples cascadas de relevancia conocida para la EA (45).

A diferencia de lo que se pensaba clásicamente, considerando que el cerebro era insensible a la insulina, se ha demostrado que la presencia de receptores de insulina (IR) en el cerebro proporciona suficiente evidencia de que este es un órgano diana para este sustrato. De hecho, la insulina ejerce múltiples efectos en el cerebro, incluidas las acciones neurotróficas, neuromoduladoras y neuroendocrinas.

Merece especial mención señalar que los estudios epidemiológicos recientes indican que la diabetes aumenta significativamente el riesgo de desarrollar EA , lo que sugiere que puede tener un papel causante en el desarrollo de la patogénesis de la EA (46). Por otro lado, ambas enfermedades comparten varias características clínicas y bioquímicas, lo que sugiere que presenten vías moleculares comunes subyacentes (47).

Asimismo, la insulina afecta, directa o indirectamente, a diferentes vías como la PI3K/AKT, GSK-3 β o a la producción de A β , entre otros (45). Más aún, diversos estudios han demostrado que la

presencia de diabetes tipo 1 o tipo 2 en modelos de ratón da como resultado un aumento en la fosforilación de tau frente a controles normales (48). Se propone entonces la hipótesis de que la señalización defectuosa de la insulina en la EA contribuye a la hiperfosforilación de tau, la deposición de A β , la neuroinflamación, la disrupción de la plasticidad sináptica y, en consecuencia, a un aumento en el deterioro de la memoria y la cognición (45).

En resumen, la evidencia reciente revela que la señalización aberrante de la insulina en el cerebro contribuye a la patogénesis de la EA (49,50), y la resistencia a la insulina en el cerebro es una característica común temprana de la EA. De hecho algunos investigadores teorizan que tal vez la EA es un tipo específico de diabetes que denominan “diabetes tipo 3” (49).

1.10. FACTORES GENÉTICOS EN LA EA

Según la etiología la EA puede ser esporádica o familiar. Según la edad de inicio, la EA se clasifica como de aparición temprana o tardía, situándose la barrera entre ellas aproximadamente en los 65 años.

Por tanto, la forma esporádica aparece en personas mayores de 65 años y representa más del 95-99% de los casos de EA. Las causas exactas de la forma esporádica son aún desconocidas y aún no se comprenden.

Por su parte, menos del 5% restante de los casos de EA constituyen la forma familiar de inicio temprano, que se hereda genéticamente a través de la mutación de varios genes, entre los que mayor relevancia presentan encontramos el gen de la proteína precursora amiloide (APP, cromosoma 21), la presenilina 1 (PS1, cromosoma 14) o la presenilina 2 (PS2, cromosoma 1) (51,52). Debido a la localización del gen APP en el cromosoma 21, se ha observado un efecto de dosis génica en el síndrome de Down, causando aparición temprana en estos afectos (53). Por su parte las presenilinas son las enzimas constituyentes de los complejos de secretasas encargados de procesar a la APP (54). Las mutaciones patógenas en estos genes se caracterizan porque alteran su actividad γ -secretasa y, en consecuencia, el procesamiento proteolítico de APP. Como resultado convergen en un mecanismo general de aumento en la acumulación de A β 1-42 o aumento de la relación A β 1-42 / A β 1-40 (55).

Por lo general, la forma hereditaria de la enfermedad tiende a ser agresiva, tiene un inicio temprano aproximadamente a los 30 años y sigue un patrón de herencia mendeliano (46). De hecho, se sabe que las mutaciones en PS1 o APP están asociadas con una penetrancia completa, lo que significa que un individuo que hereda una mutación en uno de estos genes tiene

garantizado el desarrollo de EA. Mientras que la mutación en PS2 tiene una penetrancia del 95% y, por lo tanto, no todas las personas que tienen la mutación desarrollan la enfermedad.

Otro de los descubrimientos derivados de los estudios genéticos a familias con formas tardías, pero genéticamente ligadas a la EA, fue la importancia del genotipo del gen apolipoproteína E (APOE). En relación a la influencia genética en la EA esporádica, una serie de estudios denominados genome-wide association studies (GWAS, «estudios de asociación del genoma completo»), sugieren como factores de riesgo a los polimorfismos en los genes de las principales apolipoproteínas transportadoras de colesterol en el SNC, apoE y clusterina (apoJ). Diversos estudios clínicos y patológicos señalan la existencia de una asociación significativa entre el deterioro de la homeostasis lipídica cerebral, los cambios vasculares y la fisiopatología de la EA esporádica (56,57).

El alelo APOE e4 constituye el factor de riesgo genético más conocido para la EA. La susceptibilidad genética como la herencia del gen APOE4 aumenta el riesgo de tener EA. De hecho, las personas que heredan una copia del alelo APOE4 4 tienen un riesgo 3,5 veces mayor de desarrollar EA, mientras que tener dos copias del alelo APOE4 4 aumenta el riesgo en 8 a 15 veces. El APOE4 4 está presente en aproximadamente el 14% de la población general y en 40-60% de todos los casos de EA en una o dos copias (58). La presencia de cada copia del alelo APOE 4 reduce la edad de inicio de la EA en 6-7 años de una manera dependiente de la dosis. Sin embargo, la presencia del alelo 4 no es suficiente o necesaria para desarrollar EA. Si bien la presencia del gen APOE 4 se estima que es un factor de riesgo para desarrollar EA, se considera que tener el alelo APOE 2, presente en aproximadamente el 8,4% de la población general, ejerce un efecto protector frente al desarrollo de la EA (59).

A pesar de que los mecanismos que hacen que la forma APOE4 resulte neurotóxica todavía se desconocen, existen dos factores que parecen verse afectados por su presencia : la variante e4 afecta al grado de agregación del péptido amiloide, promoviendo su fibrilación, y los portadores de esta variante presentan una menor capacidad de aclaramiento del A β en el parénquima cerebral (60). Sin embargo se requieren más estudios dirigidos a elucidar su verdadero papel en la cascada amiloidogénica.

1.11. CORRELACIÓN ANATOMOPATOLÓGICA/CLÍNICOPATOLÓGICA

Los médicos, y reputados anatomopatólogos mundiales, Heiko Braak y Eva Braak describieron en 1991 como las alteraciones neuropatológicas características de la EA presentan una distribución específica y progresiva en el cerebro de los pacientes. Actualmente la presencia temporal de estas alteraciones constituye uno de los criterios neuropatológicos más importantes en la EA (61). Brevemente, Braak y Braak elaboraron seis estadios de la EA

atendiendo a criterios neuropatológicos y de deterioro cognitivo. En etapas tempranas (estadios de Braak: I-III), la acumulación extracelular de Ab y la intracelular de NFT se circunscribe principalmente a la corteza entorrinal del lóbulo temporal medial, mientras que en las etapas posteriores (estadios de Braak: IV-VI) afectan progresivamente hacia áreas de la neocorteza.

La propagación gradual de las NFT (etapas I-VI de Braak) se correlaciona mejor con la progresión de los déficits cognitivos que la deposición de A β , que a menudo es difusa en el momento de presentación de los síntomas. Los primeros síntomas de EA tienden a relacionarse con la memoria, cuando estos depósitos neurofibrilares se observan en la corteza entorrinal y transentorrinal del lóbulo temporal medial (etapas III-V de Braak). Las áreas cognitivas afectadas en la EA en la etapa media y tardía se extienden para incluir áreas de función ejecutiva, relacionadas con capacidades visoespaciales y el habla. Estas manifestaciones ocurren en sincronía con el desarrollo de NFT en las áreas neocorticales responsables de esas funciones (etapas de Braak V-VI) (62,63).

1.12. MODELOS ANIMALES PARA LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Durante las últimas décadas ha supuesto un gran reto reproducir la patología neuronal y la sintomatología comportamental de la EA en modelos animales (64). Con el objetivo de disponer de un modelo de EA, se han creado y caracterizado una gran cantidad de ratones transgénicos en las dos últimas décadas (65–67). Se ha descubierto que los ratones que sobreexpresaban formas mutadas de la APP, desarrollaron depósitos de A β en su cerebro, junto con déficits de memoria cuantificable (68–71). En este sentido se han creado diferentes modelos de ratones con mutaciones monogénicas y bigénicas que en la mayor parte de los casos no mostraban las alteraciones neuropatológicas observadas en el cerebro *post mortem* del paciente con EA.

Con esta limitación principal y dado que el diagnóstico de EA depende de la visualización histológica de las placas de A β y de NFT, el equipo del Dr. Frank LaFerla creó un modelo triple transgénico (3xTg-AD) que expresa tres transgenes: proteína precursora de A β humana mutada (APP^{Swe}), mutación knock-in de la presenilina-1 murina (PS1M146V) y tauP301L humana mutada (68,70,71). Este linaje de ratones desarrolla progresivamente tanto patologías A β como depósitos de proteína tau en regiones cerebrales relevantes para la EA, así como déficits en la plasticidad sináptica a largo plazo y el rendimiento cognitivo (68,70–72). Dichas manifestaciones aparecen y se establecen de manera dependiente a la edad, apareciendo las placas amiloides a los 3 meses de edad, y las NFT a los 12 meses de edad en el hipocampo y la corteza (68).

1.13. OBJETIVOS

El principal objetivo que nos planteamos con este estudio era dilucidar si en el modelo triple transgénico de EA en un estadio temprano existían alteraciones cognitivas y otros síntomas psicológicos (ansiedad), empleando para ellos animales machos.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Animales

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

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

Los ratones fueron destetados a los 21 días de edad y alojados en grupos de 2-4 compañeros de camada en jaulas de plástico (18,75 cm x 28 cm x 12,5 cm), con un tubo de PVC (4 cm de diámetro x 7 cm de longitud) para el enriquecimiento. Se les proporcionó comida y agua ad libitum. Cuando se precise los ratones serán genotipados usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de muestras de tejido obtenidas por punción de oído.

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

2.2. Pruebas de comportamiento realizadas

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

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

solución al 30% de etanol.

2.2.1. Test de laberinto elevado.

La prueba del laberinto elevado (del inglés Elevated plus maze, o EPM) es un paradigma validado para evaluar el comportamiento asociado con la ansiedad en roedores(73). De igual manera proporciona medidas simultáneas de locomoción y exploración. Se empleó un protocolo validado previamente y adaptado de estudios previos (74,75).

El laberinto elevado utilizado en este trabajo está construido en plexiglás y consta de cuatro brazos y una plataforma central. Dos de los brazos son abiertos (45x5 cm) presentando bordes de 0.25 cm para evitar que el roedor se pueda caer durante el procedimiento. Los otros dos brazos (45x5 cm) están cerrados con paredes de 40 cm. El tamaño de la plataforma central es de 5x5 cm. El suelo del laberinto está hecho de plexiglás negro mientras que los bordes están elaborados en plexiglás transparente. El laberinto está elevado 45 cm sobre el suelo (74). En este test la tendencia de los ratones a explorar entornos nuevos se contrarresta con la ansiedad relacionada con la exposición (brazo abierto) y la elevación del test.

Tras la habituación de la sala los ratones se colocaron sobre la plataforma central frente a un brazo cerrado, elegido aleatoriamente y se les permitió explorar el aparato durante 5 minutos (74,75), para posteriormente ser retornados a sus jaulas de origen. Todas las pruebas se realizaron bajo iluminación tenue para controlar el estrés debido a la exposición a la luz. Entre las sesiones de prueba, el aparato se limpió a fondo con etanol 30%. El comportamiento en el aparato EPM fue grabado en video usando una videocámara (Sony, Canadá) y analizado por un observador ciego, que desconocía las condiciones experimentales, en una computadora de PC mediante el programa Smart 2.5.19. Para fines de puntuación, se anotó una entrada de brazo cuando las cuatro patas más la base de la cola pasaron el umbral del brazo. Cuantificamos el número total de entradas abiertas y cerradas, así como la cantidad de tiempo invertido en estas áreas del aparato de prueba. De igual manera se evaluó el número de veces que el animal sumergía la cabeza en los brazos abiertos (explorando los lados del laberinto hacia el suelo) (74).

2.2.2. Test de campo abierto.

Los roedores muestran una aversión natural a las áreas abiertas iluminadas. Sin embargo, también tienen un impulso para explorar un estímulo amenazante percibido. La disminución de los niveles de ansiedad conduce a un mayor comportamiento exploratorio. El aumento de la

ansiedad dará como resultado una menor locomoción y una preferencia para permanecer cerca de las paredes del campo (thigmotaxis). Se empleó un protocolo adaptado de referencias previas (74–76).

El test de campo abierto está fabricado en conglomerado de madera pintado en color blanco y posee unas medidas de 72x72 cm. El test está dividido en 16 cuadrados de tamaño 18x18 cm mediante líneas negras (74). El centro del campo abierto posee un cuadrado central de 36x36 cm resaltado en color rojo. Al comienzo de la prueba, el animal se colocó en el centro del test y se les permitió explorar libremente el laberinto durante cinco minutos.

Se evaluaron los siguientes parámetros:

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

Tras la realización de la prueba el animal fue devuelto a su jaula y a semejanza del experimento anterior su desempeño en el test de campo abierto fue grabado en video usando una videocámara (Sony, Canadá) y analizado por un observador ciego, que desconocía las condiciones experimentales, en una computadora de PC mediante el programa Smart 2.5.19 (75).

2.2.3. Test de reconocimiento de objetos

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

previas (74,75,77).

El suelo del aparato de campo abierto está hecho de madera pintada en color blanco, y sus medidas son de 72x72. Está dividido en 16 cuadrados de 18x18 cm mediante líneas negras (74). El cuadrado central que queda limitado a partir de los cuadrados internos (18x18 cm) fue resaltado en color rojo.

Los animales fueron habituados al aparato (sin exponerlos a los objetos) durante 10 minutos, en 2 días consecutivos (77). Posteriormente se realizaron dos ensayos.

a. Primer ensayo: familiarización

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

b. Segundo ensayo: prueba

Después de un intervalo de 30 minutos, el ratón que había realizado el primer ensayo se reintrodujo en la caja, que ahora contenía uno de los objetos familiares de la prueba anterior (O2) en la misma posición y uno nuevo (O3), de tamaño similar, que reemplazaba a otro de los objetos (O1). El ratón se colocó en el centro del aparato y se soltó para explorar la caja y los objetos durante 10 minutos. (75)

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

Se registraron las siguientes conductas (74):

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

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

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

2.3. Análisis estadístico

Todos los análisis fueron realizados por un observador cegado a las condiciones experimentales de las muestras. Aunque el tamaño de la muestra obtenida era muy bajo, realizamos una simulación de análisis estadístico. Para ello realizamos el test de normalidad de Shapiro-Wilk a nuestras poblaciones muestrales. En los grupos que cumplían criterios de normalidad las diferencias significativas se determinaron empleando la prueba t de Student. En aquellos grupos que no seguían un criterio de normalidad se aplicó el test no paramétrico U de Mann-Whitney. La probabilidad significativa establecida fue $\alpha < 0.05$. Los análisis estadísticos y representaciones gráficas fueron realizados con el software GraphPad Prism V5 (GraphPad, La Jolla, CA, EE. UU.).

3. RESULTADOS

3.1 Prueba de laberinto elevado

En la prueba de laberinto elevado se emplearon 3 ratones macho 3xTg-AD y 3 ratones macho control, midiendo durante 5 minutos tanto el número de entradas como el tiempo transcurrido en los brazos abiertos como en los brazos cerrados, así como el tiempo transcurrido en el centro del laberinto (Figura 1).

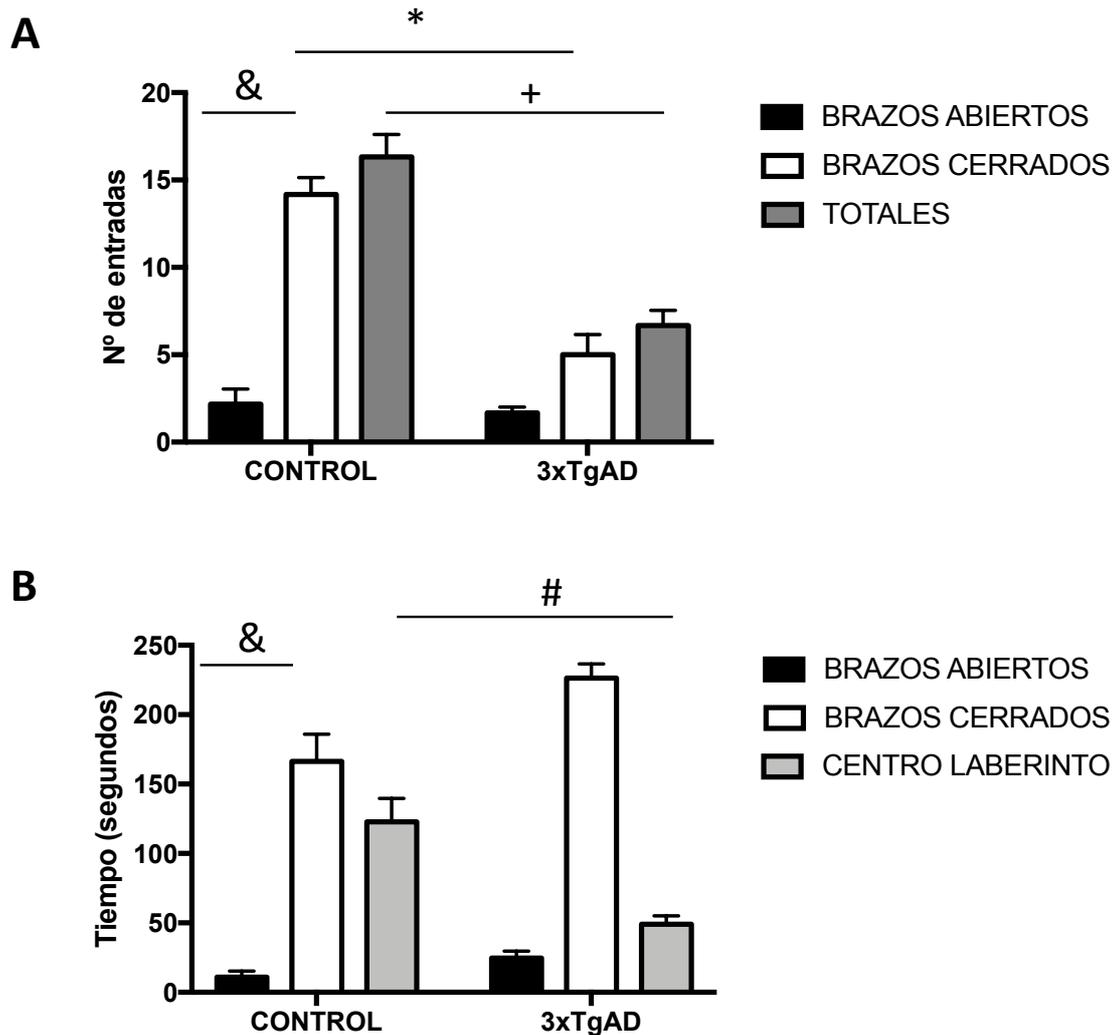


Figura 1. Prueba del laberinto elevado. Resultados de la prueba de laberinto elevado obtenidos en ratones machos 3xTgAD (n=3) y controles (n=3). Se evaluó el número de entradas en brazos abiertos y cerrados y total de entradas (A), así como tiempo transcurrido en cada parte del laberinto (B). Se observaron diferencias significativas entre ambos grupos en el número de entradas en brazos cerrados, en el número de entradas totales y en el tiempo de permanencia en el centro del laberinto. * $p < 0.05$ (diferencias en el número de entradas en los brazos cerrados entre animales controles vs 3xTgAD); + $p < 0.005$ (diferencias

en el número de entradas totales entre animales controles vs 3xTgAD); # $p < 0.005$ (diferencias en el tiempo transcurrido en centro entre animales controles vs 3xTgAD); & . $p < 0.005$ (diferencias en el tiempo transcurrido/ nº entradas a los brazos abiertos y cerrados en grupo control). Para el análisis estadístico se realizó el test no paramétrico de la prueba U de Mann-Whitney.

En esta prueba , los ratones 3xTg-AD realizaron un menor número de entradas en los brazos cerrados del laberinto elevado en comparación al grupo control ($p < 0.05$). De igual manera los ratones transgénicos realizaron un menor número de entradas totales ($p < 0.05$). Por otro lado, el número de entradas en los brazos abiertos fue prácticamente igual en ambos grupos no hallando diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.9405$). Asimismo, los ratones triple transgénicos estuvieron menos tiempo en los brazos cerrados, no siendo significativa esta variable ($p = 0.0833$). Con respecto al tiempo en los brazos abiertos del laberinto, tampoco se evidenció ninguna diferencia significativa entre los grupos ($p = 0.1190$) pero sí en el tiempo de estancia en el centro del laberinto, donde los ratones control permanecían significativamente más tiempo que los ratones 3xTgAD ($p < 0.05$).

De igual manera comparamos estas variables dentro de los grupos. Observamos que los animales control visitaban con mayor frecuencia los brazos cerrados que los brazos abiertos ($p < 0,0001$) no existiendo esta diferencia en los animales 3xTgAD. La misma tendencia se observó cuando comparamos el tiempo que los animales pasaban en los brazos cerrados y abiertos, observándose un aumento significativo del tiempo que pasan en los brazos cerrados frente al tiempo en los abiertos ($p = 0,002$) no existiendo esta diferencia en los animales 3xTgAD (ver tabla 1).

También realizamos una comparativa de la influencia del lugar en el tiempo transcurrido (comparamos brazos abiertos, cerrados y centro del laberinto mediante un test no paramétrico de Kruskal-Wallis). Se observó una interacción del lugar preferido en el tiempo que el animal pasa en él tanto en los animales control ($F: 12,14$; $p < 0,0001$) como en los animales transgénicos ($F: 7,27$; $p = 0,004$).

Finalmente también se cuantificó el número de veces que los ratones sumergían la cabeza en los brazos abiertos del laberinto (Figura 2).

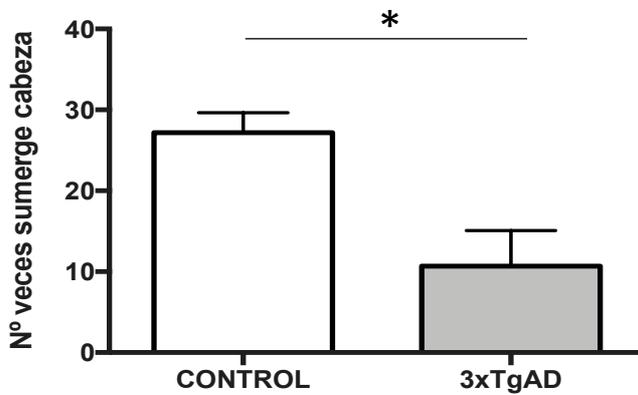


Figura 2. Evaluación del nº de veces que el animal sumerge la cabeza. Resultados de la prueba de laberinto elevado obtenidos en ratones machos 3xTgAD (n=3) y controles (n=3). Se evaluó el número de veces que los animales sumergían la cabeza entre los brazos abiertos. El análisis estadístico empleando el test de Mann-Whitney mostró un aumento en el número de veces que sumergían la cabeza en los animales controles frente a los 3xTgAD (*p< 0.05).

En relación a esta variable, se registró un menor número de sumersiones con la cabeza en el laberinto por parte de los ratones transgénicos (p<0.05) (ver tabla 1).

A continuación, se muestra la tabla de los resultados obtenidos con esta prueba, con su respectiva significación (Tabla 1).

Prueba de laberinto elevado	Significación(p)
Número entradas brazos cerrados (control vs 3xTgAD)	p=0.024
Número entradas brazos abiertos (control vs 3xTgAD)	p=0.941
Número total de entradas (control vs 3xTgAD)	p=0.012
Número entradas brazo abierto vs cerrado (en g. Control)	p<0,0001
Número entradas brazo abierto vs cerrado (en g. 3xTgAD)	p=0.100
Tiempo en brazos cerrados (control vs 3xTgAD)	p=0.083
Tiempo en brazos abiertos (control vs 3xTgAD)	p=0.119
Tiempo en el centro (control vs 3xTgAD)	p=0.024
Tiempo brazo abierto vs cerrado (grupo control)	p=0.002
Tiempo brazo abierto vs cerrado (grupo 3xTgAD)	p=0.100
Sumerge la cabeza (control vs 3xTgAD)	p=0.048

Tabla 1. Resumen de la significación de los diferentes parámetros evaluados en el test del laberinto elevado. En negrita se realzan los hallazgos significativos.

3.2. Prueba de campo abierto

En la prueba de campo abierto fueron empleados 3 ratones macho 3xTg-AD y 3 ratones macho control, cuantificando durante 5 minutos el número de cruces de línea, así como el número de entradas en el cuadro central y la duración dentro de este (figura 3).

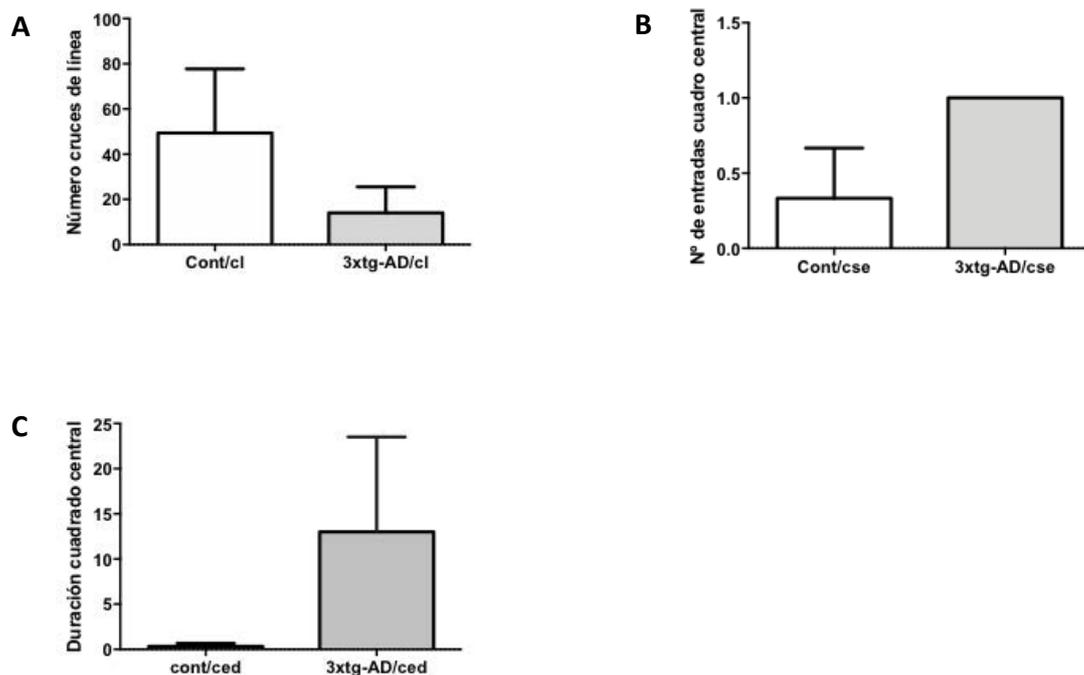


Figura 3. Análisis de las entradas en el cuadro central y número de cruces de línea en la prueba de campo abierto. Se evaluaron el número de cruces de línea (A) el número de entradas en el cuadrado central (B) y la duración en el cuadro central (C) de ratones 3xTgAD (n=3) y controles (n=3). El análisis de los resultados no mostró diferencias significativas en ninguno de estos parámetros al comparar los controles vs 3xTgAD. Para el análisis estadístico se realizó el test no paramétrico de la prueba U de Mann-Whitney excepto para la variable cruce de líneas, en la cual se aplicó la T- de Student.

Se observó que los ratones 3xTg-AD presentaron una menor tendencia a la actividad que los controles no transgénicos en el campo abierto, realizando un menor número de cruces de línea, aunque no se hallaron diferencias significativas.

También se advirtió que ambos grupos entraron escasamente en el cuadrado central, y de hacerlo su permanencia en el mismo era breve sin evidenciar ninguna diferencia significativa entre los grupos.

Por otro lado, se calcularon otras variables como son el número de estiramientos, número de

elevaciones, tiempo de aseo así como tiempo de “freezing”, tanto de los ratones transgénicos como de los controles (figura 4).

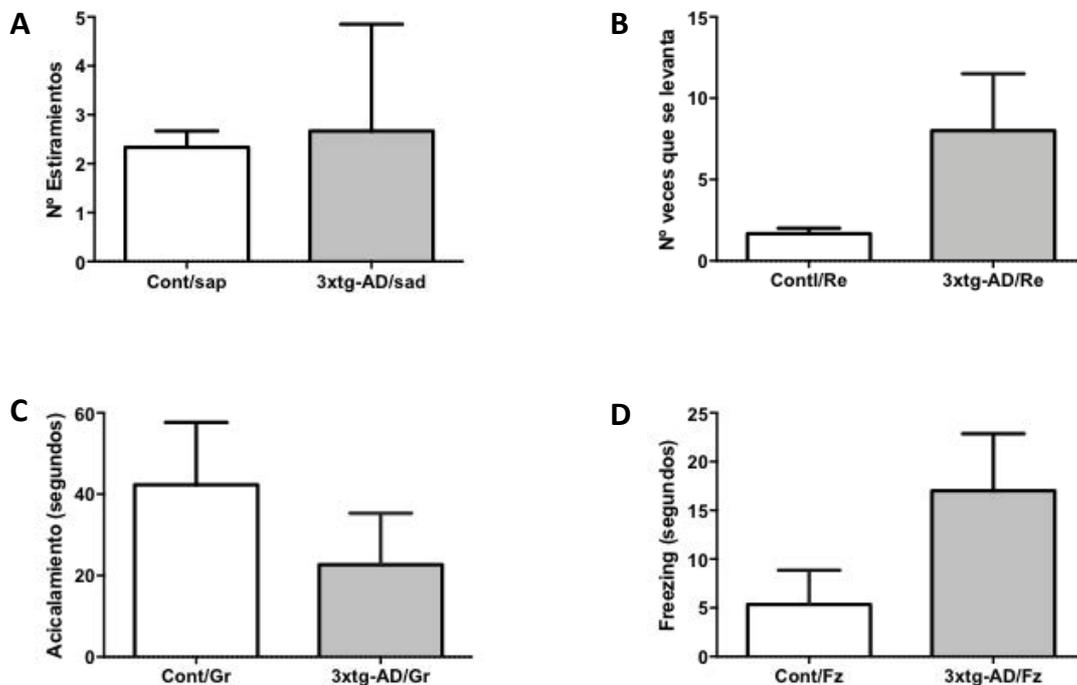


Figura 4. Medida de los procesos de ansiedad, congelación (freezing) y de acicalamiento en el test de campo abierto. Se evaluaron el número de veces que los animales se estiraban (A), levantaban (B), el tiempo destinado a conductas de acicalamiento (C) y el tiempo que el animal se encontraba en congelación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

Aunque los ratones 3xTg-AD mostraron valores ligeramente superiores en el número de estiramientos, tampoco se encontraron diferencias significativas en comparación al grupo control. De igual modo, a pesar de que los ratones transgénicos se alzaron con mayor frecuencia, tampoco se determinaron diferencias significativas en este caso.

Asimismo, se observó que los ratones transgénicos permanecían más tiempo inmóviles (freezing) que los ratones del grupo control, no hallándose ningún resultado estadísticamente significativo.

Finalmente, los ratones del grupo control se acicalaron durante más tiempo que los transgénicos, sin evidenciar tampoco ninguna diferencia significativa entre ambos grupos.

En la siguiente tabla se muestra la síntesis de los diferentes parámetros valorados en esta prueba con su correspondiente significación:

Prueba de campo abierto	Significación
Cruce de líneas	p=0.400
Entradas cuadrado central	p=0.400
Tiempo en cuadrado central	p=0.100
Estiramientos	p=0.600
Levantarse	p=0.100
Acicalamiento	p=0.300
Freezing	p=0.200

Tabla 2. Datos prueba de campo abierto. P <0.05 indica una diferencia significativa entre genotipos y p> 0.05 un hallazgo no significativo.

3.3 Prueba de reconocimiento de objetos (NORT: *Novel Object Recognition Test*)

En la prueba de reconocimiento de objetos se emplearon 3 ratones macho 3xTg-AD y 3 ratones macho control. Este test constaba de dos fases: una primera fase de familiarización donde los ratones fueron expuestos a dos objetos iguales, cuantificando el número de aproximaciones a cada uno de ellos y el tiempo que permanecieron junto a estos (figura 5); seguida de una segunda fase de 10 minutos de duración, en la que se cuantificaron los mismos parámetros, pero cambiando uno de los objetos conocidos por uno nuevo (figura 6).

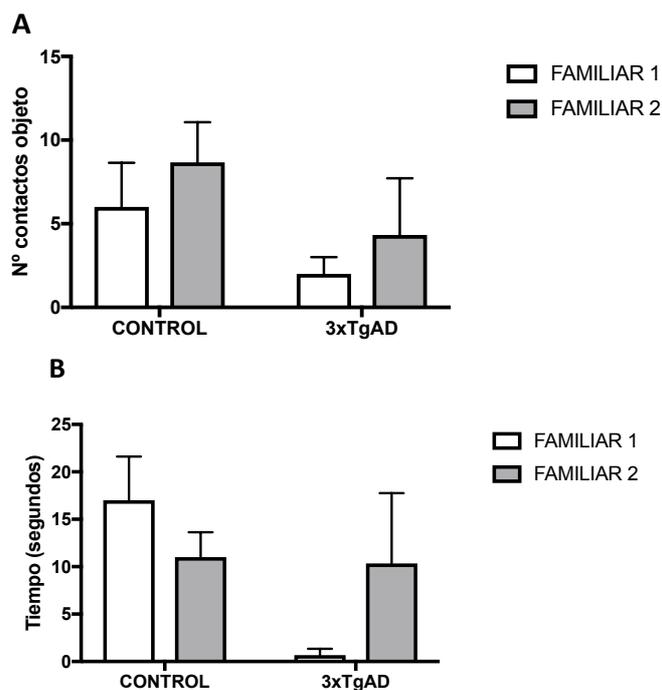


Figura 5. Resultados de la fase de familiarización en la tarea de reconocimiento de objetos novedosos (NOR). En la gráfica se representan el número de contactos con cada uno de los objetos (familiar 1 y

familiar 2) por parte de los ratones transgénicos y controles (A), y el tiempo que interaccionaban con ellos (B). El análisis de los resultados no mostró diferencias significativas ($p > 0.05$) en el número de interacciones o el tiempo en el que interactuaban con los objetos en ninguno de los dos grupos experimentales, observándose por tanto que mostraban preferencia por ambos objetos por igual. Para el análisis estadístico se realizó el test no paramétrico de la prueba U de Mann-Whitney.

En la primera fase o fase de familiarización, se registraron valores ligeramente superiores en el grupo control, cuantificando un mayor número de contactos con cada objeto y tiempo cerca de cada uno de estos, hallazgos que no resultaron ser significativos. Por tanto, los resultados muestran como ambos grupos interaccionan por igual durante la fase de familiarización con cada uno de los objetos, presentando un similar número de aproximaciones y tiempo transcurrido cerca de cada uno de los objetos ($p > 0.05$).

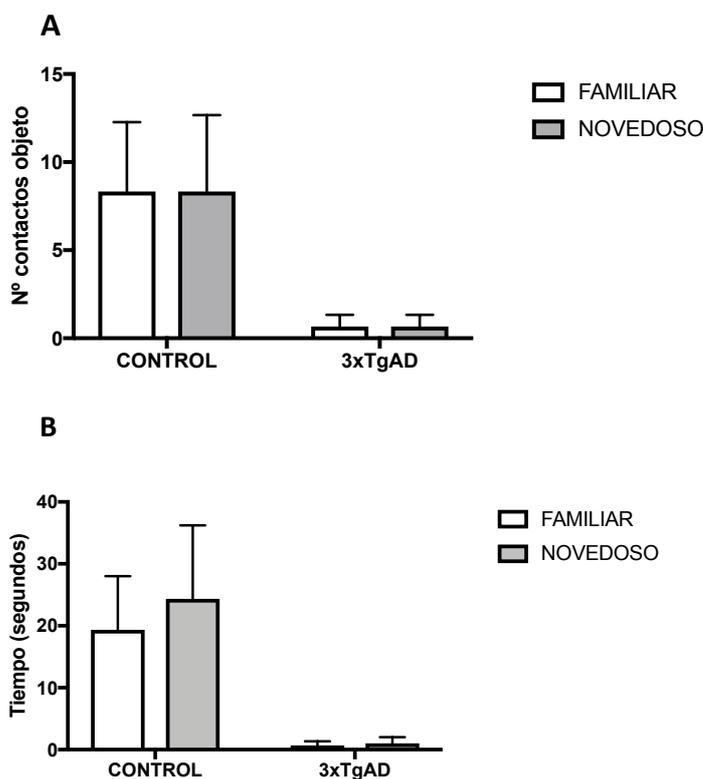


Figura 6. Resultados de la fase de test en la tarea de reconocimiento de objetos novedosos (NOR). En la gráfica se representan el número de contactos con cada uno de los objetos (familiar 1 y novedoso) por parte de los ratones transgénicos y controles (A), y el tiempo que interaccionaban con ellos (B). El análisis de los resultados no mostró diferencias significativas en la interacción con los objetos en ninguno de los grupos. Para el análisis estadístico se realizó el test no paramétrico de la prueba U de Mann-Whitney.

Por otra parte, durante la fase de prueba, se observó que los ratones del grupo control, se

aproximaron más veces a los dos objetos, permaneciendo más tiempo cerca de ambos, sin preferencia evidente por ninguno de estos. Tampoco se encontraron diferencias significativas para estos resultados en los ratones transgénicos.

A partir de los resultados, calculamos la preferencia de los ratones por los objetos empleando para ello el índice de discriminación. Este se obtiene restando el tiempo transcurrido con el objeto familiar (TF) al tiempo transcurrido explorando el objeto nuevo (TN), y dividido entre el tiempo explorando objetos nuevos y familiares. Fórmula: $(TN-TF)/(TN+TF)$.

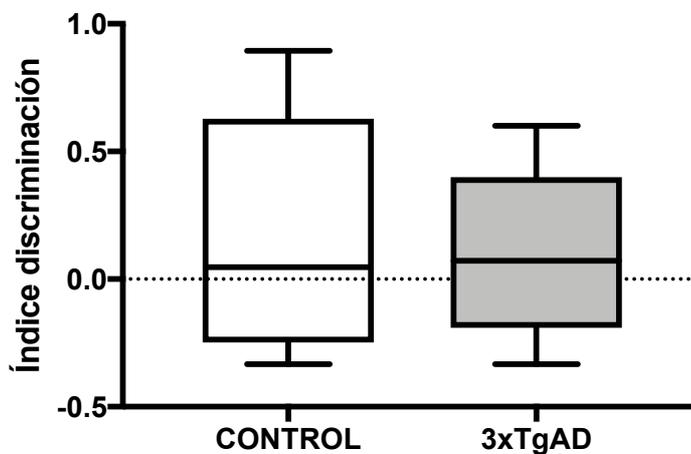


Figura 7. Índice de discriminación de objetos. Se obtiene restando el tiempo transcurrido con el objeto familiar del tiempo transcurrido explorando el objeto nuevo, y dividido entre el tiempo explorando objetos nuevos y familiares. Cuando el resultado se acerca a 1, indica que el ratón tiene preferencia por el objeto novedoso, mientras que si se acerca a -1, que prefiere el conocido.

En base a estos resultados, observamos que tanto los ratones del grupo control como los ratones 3xTg-AD no presentaron preferencia significativa por ningún objeto, situándose la mediana de ambas poblaciones cercana al valor 0.

Por otro lado, se midieron otros parámetros como son el número de cruces de línea y el número de elevaciones, el número de estiramientos y el tiempo de aseo, tanto de los ratones transgénicos como de los ratones del grupo control (figura 8).

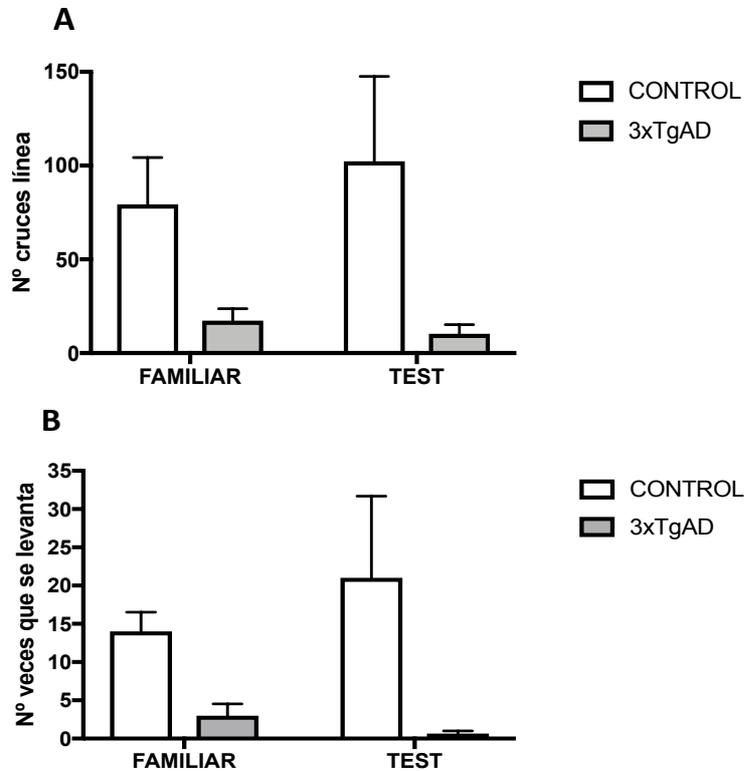


Figura 8. Valoración del número de cruces de línea y de levantamientos en la prueba NORT. En la gráfica se representan el número de cruces de línea (A), y el número de veces que el animal se eleva (B) en la prueba NORT durante la fase de familiarización y la fase test.. El análisis de los resultados no mostró diferencias significativas en ninguno de los grupos estudiados ($p > 0.05$). Para el análisis estadístico se realizó el test no paramétrico de la prueba U de Mann-Whitney, excepto para la variable cruce de líneas, en la cual se aplicó la T- de Student.

En relación a estos resultados, los ratones del grupo control presentan una mayor tendencia a cruzar las líneas tanto en la fase de familiarización como en la fase test, no siendo estadísticamente significativo este hallazgo. Por otro lado, se cuantificaron un mayor número de elevaciones en los controles, sobre todo en la fase de prueba, sin hallar resultados significativos.

Por último, se analizaron el número de estiramientos y el tiempo de aseo o acicalamiento de ambos grupos de animales.

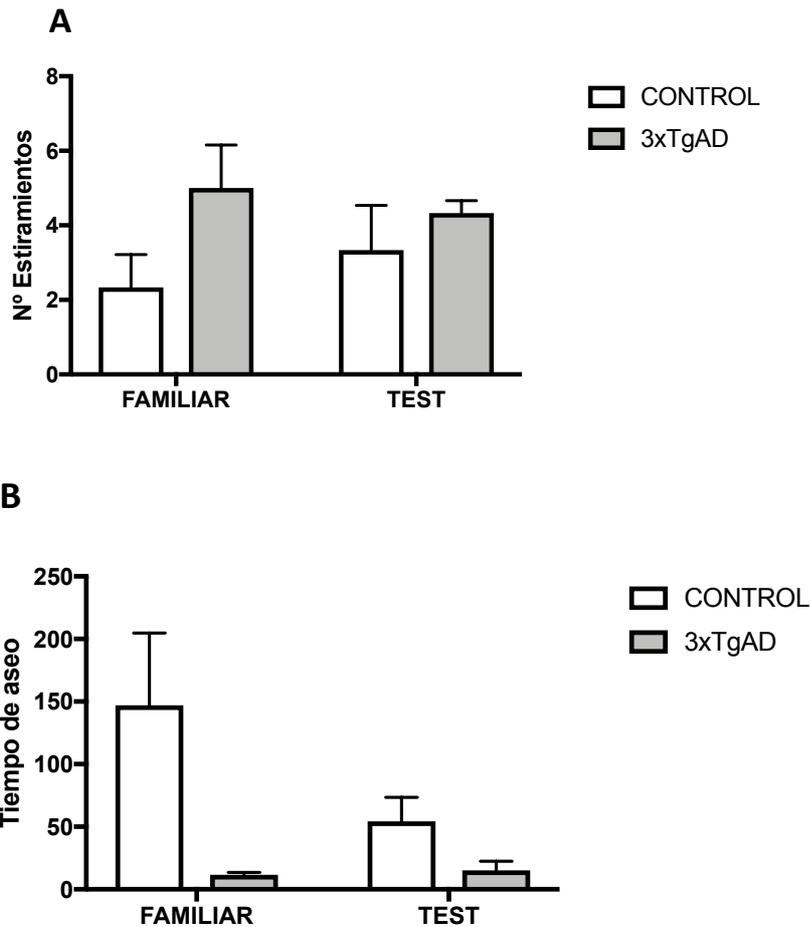


Figura 9. Valoración del número de estiramientos y conducta de aseo en la prueba NORT. En la gráfica se representan el número de estiramientos (A), y el tiempo que el animal dedicaba a la conducta de aseo (B) en la prueba NORT durante la fase de familiarización y la fase test. El análisis de los resultados no mostró diferencias significativas en ninguno de los grupos estudiados ($p > 0.05$). Para el análisis estadístico se realizó el test no paramétrico de la prueba U de Mann-Whitney., excepto para la variable tiempo de aseo, en la cual se aplicó la T- de Student.

Se observó un mayor número de estiramientos en el grupo 3xTg-AD respecto al grupo control, especialmente en la fase de familiarización de la prueba, sin evidenciar ninguna diferencia estadísticamente significativa. Finalmente, se apreció una propensión al acicalamiento en el grupo control, traducido en un mayor tiempo de aseo, que tampoco resultó ser significativo al compararlo con el de los animales transgénico, que era más evidente en la fase de familiarización.

4. DISCUSIÓN

4.1. Discusión del modelo utilizado

Los modelos animales son fundamentales para comprender la patogénesis de cualquier enfermedad, y más concretamente de la EA, y también sirven como herramientas valiosas para las pruebas preclínicas. Una de las consideraciones más importantes al trabajar con modelos murinos es hacer coincidir el ratón con la pregunta experimental bajo estudio. Hay más de 100 líneas diferentes de ratón diseñadas genéticamente que se han indicado para estudiar algún aspecto de la EA, tantas que es imposible rastrearlas exhaustivamente (78).

Para realizar nuestro estudio, se empleó el modelo de ratón 3xTg-AD ya que es el único que expresa tres genes principales asociados con la EA familiar (43,79), así como presenta los cambios conductuales y neuropatológicos correspondientes que se observan en la forma humana (80–83). Este modelo se diseñó como un análogo murino para asemejar los síntomas de la EA en humanos. Al igual que con cualquier modelo animal de una enfermedad humana, es poco probable que todo los comportamientos se repliquen exactamente; sin embargo, cuanto más se parezca el modelo a la fisiopatología de la enfermedad, más probable será que los investigadores puedan desarrollar tratamientos funcionales para el ser humano (84). Como reflejo de lo que se ve en pacientes con EA, el ratón 3xTg-AD tiene déficits de memoria, así como presencia de acumulaciones A β y tau, mostrando niveles de tau totales similares en el fluido cerebroespinal a diferencia de otros modelos de patología tau 101 (P301L y Tg4510) (43,85). La EA se caracteriza por un aumento progresivo de los déficits cognitivos, con individuos que progresan de un deterioro cognitivo leve a un deterioro cognitivo severo a lo largo del tiempo (86,87). En base a estos resultados, es importante examinar los modelos de ratón de EA a edades tempranas para detectar signos de deterioro cognitivo y una neuropatología característica (88). Cuanto más comprendamos acerca de la neurobiología básica y el comportamiento de los modelos de EA transgénicos en ratones, más podemos beneficiarnos del uso de estos modelos, y más concretamente el 3xTgAD objeto de nuestro estudio, en la medicina traslacional (89).

4.2. Discusión de los datos obtenidos

Parece evidente que las alteraciones físicas y funcionales en la EA progresan a medida que avanza la enfermedad y, aunque en menor grado, el aparato locomotor también se compromete (90). Asimismo, se registran las alteraciones motoras durante la primera etapa de la EA como apatía y tendencia al sedentarismo que favorece la inmovilización, y acelera el deterioro físico (91). Estos hallazgos concuerdan con los resultados obtenidos en nuestro

estudio, al analizar el número de entradas en los brazos cerrados y el tiempo que permanecen en estos los ratones transgénicos, así como al cuantificar el número total de entradas en el laberinto. En la misma línea, Filali y cols.(92) demostraron que los ratones mutantes 3xTg-AD presentaban un fenotipo hipoactivo que se tradujo en un número inferior de entradas en el laberinto elevado, así como en una frecuencia inferior de sumersiones de cabeza en el laberinto y estancias de menor duración en los brazos abiertos, lo que refleja la ansiedad de dichos ratones. Estos autores proponen que esta actividad motora reducida podría estar causada por niveles más bajos de activación cerebral (92).

A diferencia de los hallazgos en común previamente mencionados, diversos estudios también observaron que esta hipoactividad también se apreciaba en la prueba de campo abierto (93–96), no coincidiendo con nuestros resultados que en esta prueba no fueron significativos. Por tanto, en base a los comportamientos de los ratones transgénicos en las diferentes pruebas mencionadas, parecen mostrar una forma leve de apatía, caracterizada por la reducción de la emotividad, así como la falta de curiosidad para explorar el campo abierto y los brazos cerrados del laberinto elevado. Estos cambios se pueden explicar por anomalías del sistema límbico preponderantes en tales mutantes (92).

Por otro lado, los ratones 3xTg-AD se empiezan a deteriorar cognitivamente aproximadamente a la edad de 3 meses (97). Al igual que en las primeras etapas de la EA, estos animales muestran una respuesta de compensación sináptica que, sin embargo, debido a la falta de suficiente soporte neurotrófico, no se mantiene (98–100). Otros autores, como Stevens y cols., rechazaron la hipótesis de que los defectos de memoria de trabajo y de referencia, en los ratones 3xTg-AD, no se muestran hasta los 6 meses de edad (64,101–103), afirmando que según sus resultados ya se evidenciaban alteraciones a los 2 meses de edad. Diversos estudios han demostrado la fuerte correlación que existe entre las formas solubles oligoméricas de A β , las deficiencias cognitivas, y la pérdida sináptica y neuronal asociadas a esta patología (104,105). En efecto, se ha demostrado que las formas solubles oligoméricas de A β , obtenidas a partir del cerebro de pacientes con la EA o de modelos transgénicos, son capaces de interrumpir los procesos de potenciación a largo plazo (LTP), aprendizaje y memoria en animales sanos (106,107). Por otra parte, los receptores de insulina en el SNC están altamente expresados en regiones relacionadas con la cognición, lo que indica que la señalización de la insulina influye en la memoria, la plasticidad neuronal y la cognición (41,108,109), lo que podría constituir una interesante línea de trabajo aplicando el modelo 3xTgAD.

La pérdida de funciones cognitivas y en concreto la alteración de la memoria, es la característica devastadora más temprana de la EA. Para evaluar estas capacidades en ratones 3xTg-AD, usamos la prueba de reconocimiento de objetos novedosos (NORT). Este test se basa en la tendencia espontánea de los roedores a explorar un objeto nuevo durante más tiempo que uno familiar. La memoria de reconocimiento requiere juicios sobre la aparición previa de estímulos. Tales juicios pueden hacerse sobre la base de la relativa familiaridad de los objetos individuales, mediante el uso de información reciente, o integrando información relativa a los objetos y la ubicación(110). Se optó por una prueba cognitiva no estresante porque los ratones 3xTg-AD muestran un alto nivel de ansiedad (70,103), lo que podría confundir la interpretación de su respuesta conductual en tareas cognitivas más estresantes. Según diversos estudios, parece que esta prueba es dependiente de la corteza perirrinal e insular (110,111).

Varios autores han evidenciado en esta prueba, que los ratones mutantes eran deficientes en el reconocimiento de objetos, de acuerdo con algunos datos previos (93,103,112). En contraste, en nuestro trabajo, no se han evidenciado diferencias significativas en el reconocimiento de objetos entre los ratones transgénicos y los controles. Curiosamente, los ratones 3xTg-AD parecen exhibir alteraciones en el reconocimiento de objetos a los 9 meses(103), hecho que podría explicar la ausencia de hallazgos significativos en nuestro estudio. Existen informes contradictorios en la literatura sobre cuándo los ratones 3xTg-AD desarrollan un déficit en esta tarea. Por su parte, lo sorprendente es que esta incapacidad para la preferencia de objetos también sea manifiesta en los animales control, lo que podría derivarse de una mala aplicabilidad o alteración existente durante la aplicación del paradigma de NORT.

En relación a la esfera conductual, los hallazgos neuropatológicos de Mastrangelo y Bowers (69), muestran niveles elevados de APP, tau y microglía activada en ratones 3xTg-AD de 2-3 meses de edad, que podrían explicar las diferencias conductuales tempranas encontradas en los ratones en diversos estudios (113). Correlacionando estos hallazgos con los de otros autores como Sterniczuk (70), se ha observado que a lo largo de las pruebas, los ratones 3xTg-AD presentaban un nivel de ansiedad superior o normal, o posiblemente una predisposición debido a su patología para un umbral de respuesta de miedo más bajo, lo que resultó en un menor comportamiento exploratorio, congruente con los hallazgos de estudios previos (64). Se advirtió un mayor nivel de ansiedad en diferentes pruebas como el campo abierto y laberinto elevado, a diferencia de nuestro estudio, donde sólo se obtuvo significación en la prueba del laberinto elevado. El aumento de la inquietud es visible en animales transgénicos, particularmente cuando se exponen a un ambiente novedoso. Además, estos estudios no observaron diferencias con

respecto a la coordinación motora y la capacidad de equilibrio, sin embargo, esto puede deberse a la edad examinada, ya que los déficits motores se vuelven más prominentes durante las últimas etapas de la EA en humanos (114).

Las alteraciones de la conducta y los cambios psicológicos son indicadores tempranos del desarrollo de la EA humana y estos cambios están claramente modelados por estos ratones (115). Los síntomas neuropsiquiátricos, como la ansiedad y la depresión, se observan comúnmente al inicio de la EA (116,117) y se han asociado con una disminución más rápida de la capacidad cognitiva (118–120). La memoria emocional depende de la actividad de la amígdala, cuyo funcionamiento alterado se ha visto implicado en la contribución a los síntomas neuropsiquiátricos (121,122). Diversas estructuras relacionadas con el lóbulo temporal medial (corteza entorrinal, hipocampo y amígdala) se ven afectados tanto por la patología A β como tau (123), especialmente en la EA temprana (43,124). Recientemente, se ha demostrado la implicación de A β intraneuronal en ratones 3xTg-AD, en la contribución a respuestas emocionales dependientes de la amígdala (comportamiento de congelación inducido por miedo) a través de la vía de las MAP quinasas (125). Estos sutiles cambios conductuales pueden estar presentes antes del inicio de la neuropatología de la EA (64).

Finalmente, y aunque no ha sido objeto de nuestro estudio, reseñar que los ratones 3xTg-AD, al igual que otros modelos transgénicos, no desarrollan una neurodegeneración franca como la que se encuentra en los cerebros con EA (61,62,63,64), que no es estrictamente una característica de la etapa tardía de EA, ya que la pérdida temprana de neuronas del hipocampo se puede observar mediante resonancia magnética en el deterioro cognitivo leve y la EA preclínica (69,70). En el mejor de los casos, solo se ha informado una pérdida neuronal muy limitada, pero no siempre generalizada, en los modelos APP / PS1, en regiones como la capa cortical 5, el subículo, las áreas CA1 / 2 del hipocampo y la circunvolución dentada (71,72). La discrepancia entre lo que se observa en el cerebro con EA en comparación con los modelos de ratón puede explicar por qué los resultados preclínicos prometedores no se traducen en ensayos clínicos exitosos (73).

En cuanto a las limitaciones de nuestro estudio, la principal es que el tamaño muestral fue muy bajo, lo que permitió hacer una aproximación estadística muy condicionada pero restringiendo las conclusiones derivadas de este estudio.

5. AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido posible gracias a la obtención del FONDOCyT2015-3A2-127 por parte de la Dra. María del Mar Pacheco Herrero, gracias al cual se financió la adquisición de los ratones transgénicos y parte del material con el que ha sido realizado este Trabajo Final de Grado.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Thies W, Bleiler L, Alzheimer's A. 2013 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's Dement* [Internet]. 2013;9(2):208–45. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23507120>
2. GBD 2013 Mortality and Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet* (London, England) [Internet]. 2015;385(9963):117–71. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61682-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61682-2)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25530442>
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4340604>
3. Brookmeyer R, Johnson E, Ziegler-Graham K, Arrighi HM. Forecasting the global burden of Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement*. 2007;3(3):186–91.
4. Hebert LE, Weuve J, Scherr PA, Evans DA. Alzheimer disease in the United States (2010-2050) estimated using the 2010 census. *Neurology*. 2013;80(19):1778–83.
5. de Pedro-Cuesta J, Virués-Ortega J, Vega S, Seijo-Martínez M, Saz P, Rodríguez F, et al. Prevalence of dementia and major dementia subtypes in Spanish populations: A reanalysis of dementia prevalence surveys, 1990-2008. *BMC Neurol*. 2009;9:55.
6. Feldman H, Woodward M. The staging and assessment of moderate to severe Alzheimer disease. *Neurology*. 2005;65(6):S10–7.
7. Association A. 2017 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's Dement* [Internet]. 2017;13(4):325–73. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jalz.2017.02.001>

8. Lawlor B. Managing behavioural and psychological symptoms in dementia. *Br J Psychiatry* [Internet]. 2002;181(6):463–5. Available from: <http://bjp.rcpsych.org/cgi/doi/10.1192/bjp.181.6.463>
9. Lyketsos CG, Carrillo MC, Ryan JM, Khachaturian AS, Trzepacz P, Amatniek J, et al. Neuropsychiatric symptoms in Alzheimer’s disease. *Alzheimers Dement* [Internet]. 2011;7(5):532–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21889116><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3299979>
10. Landes AM. Prevalence of Apathy, Dysphoria, and Depression in Relation to Dementia Severity in Alzheimer’s Disease. *J Neuropsychiatr* [Internet]. 2005;17(3):342–9. Available from: <http://neuro.psychiatryonline.org/article.aspx?articleID=101988>
11. C. Vickers J, Mitew S, Woodhouse A, M. Fernandez-Martos C, T. Kirkcaldie M, J. Canty A, et al. Defining the earliest pathological changes of Alzheimer’s disease. *Curr Alzheimer Res* [Internet]. 2016;13(3):281–7. Available from: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1567-2050&volume=13&issue=3&spage=281>
12. Kumar A, Sharma V, Singh VP, Kaundal M, Gupta MK, Bariwal J, et al. Herbs to curb cyclic nucleotide phosphodiesterase and their potential role in Alzheimer’s disease. Vol. 149, *Mechanisms of Ageing and Development*. 2015. p. 75–87.
13. Doty KR, Guillot-Sestier M-V, Town T. The role of the immune system in neurodegenerative disorders: Adaptive or maladaptive? *Brain Res* [Internet]. 2015;1617:155–73. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006899314011950>
14. Rani V, Deshmukh R, Jaswal P, Kumar P, Bariwal J. Alzheimer’s disease: Is this a brain specific diabetic condition? *Physiol Behav* [Internet]. 2016 Oct 1 [cited 2018 May 22];164(Pt A):259–67. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0031938416303067>
15. Drachman DA. The amyloid hypothesis, time to move on: Amyloid is the downstream result, not cause, of Alzheimer’s disease. *Alzheimer’s Dement*. 2014;10(3):372–80.
16. Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer’s disease: Progress and problems on the road to therapeutics. Vol. 297, *Science*. 2002. p. 353–6.
17. Huang Y, Mucke L. Alzheimer mechanisms and therapeutic strategies. Vol. 148, *Cell*.

2012. p. 1204–22.
18. Serrano-Pozo A, Frosch MP, Masliah E, Hyman BT. Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2011;1(1).
 19. Dawkins E, Small DH. Insights into the physiological function of the β -amyloid precursor protein: Beyond Alzheimer's disease. Vol. 129, *Journal of Neurochemistry*. 2014. p. 756–69.
 20. De Strooper B, Vassar R, Golde T. The secretases: enzymes with therapeutic potential in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol* [Internet]. 2010 Feb 1 [cited 2018 May 23];6(2):99–107. Available from: <http://www.nature.com/articles/nrneurol.2009.218>
 21. Burnouf S, Gorsky MK, Dols J, Grönke S, Partridge L. A β 43 is neurotoxic and primes aggregation of A β 40 in vivo. *Acta Neuropathol* [Internet]. 2015;130(1):35–47. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00401-015-1419-y>
 22. Welander H, Frånberg J, Graff C, Sundström E, Winblad B, Tjernberg LO. A β 43 is more frequent than A β 40 in amyloid plaque cores from Alzheimer disease brains. *J Neurochem*. 2009;110(2):697–706.
 23. Gallegos S, Pacheco C, Peters C, Opazo C, Aguayo LG. Features of alpha-synuclein that could explain the progression and irreversibility of Parkinson's disease. *Front Neurosci*. 2015;9(FEB).
 24. Riley KP, Snowdon DA, Markesbery WR. Alzheimer's neurofibrillary pathology and the spectrum of cognitive function: Findings from the Nun Study. *Ann Neurol*. 2002;51(5):567–77.
 25. Herrup K. The case for rejecting the amyloid cascade hypothesis. *Nat Neurosci*. 2015;18(6):794–9.
 26. Blessed G, Tomlinson BE, Roth M. The association between quantitative measures of dementia and of senile change in the cerebral grey matter of elderly subjects. *Br J Psychiatry* [Internet]. 1968 Jul [cited 2018 May 23];114(512):797–811. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5662937>
 27. Billingsley ML, Kincaid RL. Regulated phosphorylation and dephosphorylation of tau protein: effects on microtubule interaction, intracellular trafficking and neurodegeneration. *Biochem J* [Internet]. 1997;323 (Pt 3(3):577–91. Available from: <http://www.biochemj.org/bj/323/0577/bj3230577.htm>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9169588>
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?arti>

d=PMC1218358

28. Mawal-Dewan M, Trojanowski JQ, Lee VM-Y. Tau Phosphorylation and Dephosphorylation in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. 1996 [cited 2018 May 23];109–26. Available from: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-662-03248-0_7
29. D'Amelio M, Rossini PM. Brain excitability and connectivity of neuronal assemblies in Alzheimer's disease: from animal models to human findings. *Prog Neurobiol* [Internet]. 2012 Oct [cited 2018 May 23];99(1):42–60. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301008212001098>
30. Simonian NA, Coyle JT. Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1996;36:83–106.
31. Mao P, Reddy PH. Aging and amyloid beta-induced oxidative DNA damage and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease: Implications for early intervention and therapeutics. Vol. 1812, *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. 2011. p. 1359–70.
32. Wyss-Coray T, Rogers J. Inflammation in Alzheimer disease-A brief review of the basic science and clinical literature. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012;2(1).
33. Streit WJ. Microglial activation and neuroinflammation in Alzheimer's disease: a critical examination of recent history. *Front Aging Neurosci* [Internet]. 2010;2:22. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20577641
34. Spangenberg EE, Green KN. Inflammation in Alzheimer's disease: Lessons learned from microglia-depletion models. Vol. 61, *Brain, Behavior, and Immunity*. 2017. p. 1–11.
35. Rubio-Perez JM, Morillas-Ruiz JM. A Review: Inflammatory Process in Alzheimer's Disease, Role of Cytokines. *Sci World J* [Internet]. 2012;2012:1–15. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/tswj/2012/756357/>
36. Heppner FL, Ransohoff RM, Becher B. Immune attack: The role of inflammation in Alzheimer disease. Vol. 16, *Nature Reviews Neuroscience*. 2015. p. 358–72.
37. Selkoe DJ. Alzheimer's disease is a synaptic failure. Vol. 298, *Science*. 2002. p. 789–91.
38. Scheff S. Synaptic pathology in Alzheimer's disease: a review of ultrastructural studies. *Neurobiol Aging* [Internet]. 2003 Dec [cited 2018 May 23];24(8):1029–46. Available

- from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0197458003001805>
39. Martini AC, Forner S, Trujillo-Estrada L, Baglietto-Vargas D, LaFerla FM. Past to Future: What Animal Models Have Taught Us About Alzheimer's Disease. *J Alzheimer's Dis* [Internet]. 2018 Feb 28 [cited 2018 May 23];Preprint(Preprint):1–14. Available from: <http://www.medra.org/servlet/aliasResolver?alias=iospress&doi=10.3233/JAD-179917>
 40. Scheff SW, Neltner JH, Nelson PT. Is synaptic loss a unique hallmark of Alzheimer's disease? *Biochem Pharmacol* [Internet]. 2014;88(4):517–28. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2013.12.028>
 41. Davies CA, Mann DMA, Sumpter PQ, Yates PO. A quantitative morphometric analysis of the neuronal and synaptic content of the frontal and temporal cortex in patients with Alzheimer's disease. *J Neurol Sci*. 1987;78(2):151–64.
 42. Gómez-Isla T, Hollister R, West H, Mui S, Growdon JH, Petersen RC, et al. Neuronal loss correlates with but exceeds neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Ann Neurol*. 1997;41(1):17–24.
 43. Oddo S, Caccamo A, Kitazawa M, Tseng BP, LaFerla FM. Amyloid deposition precedes tangle formation in a triple transgenic model of Alzheimer's disease. In: *Neurobiology of Aging*. 2003. p. 1063–70.
 44. Aubert L, Pichiéri S, Hommet C, Camus V, Berrut G, De Decker L. Association between comorbidity burden and rapid cognitive decline in individuals with mild to moderate alzheimer's disease. *J Am Geriatr Soc*. 2015;63(3):543–7.
 45. Craft S, Cholerton B, Baker LD. Insulin and Alzheimer's disease: untangling the web. *J Alzheimers Dis* [Internet]. 2013 [cited 2018 May 23];33 Suppl 1:S263-75. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22936011>
 46. Sutherland GT, Lim J, Srikanth V, Bruce DG. Epidemiological Approaches to Understanding the Link Between Type 2 Diabetes and Dementia. *J Alzheimer's Dis* [Internet]. 2017 Jul 17 [cited 2018 May 23];59(2):393–403. Available from: <http://www.medra.org/servlet/aliasResolver?alias=iospress&doi=10.3233/JAD-161194>
 47. Baglietto-Vargas D, Shi J, Yaeger DM, Ager R, LaFerla FM. Diabetes and Alzheimer's disease crosstalk. Vol. 64, *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 2016. p. 272–87.
 48. Abbondante S, Baglietto-Vargas D, Rodriguez-Ortiz CJ, Estrada-Hernandez T, Medeiros R, Laferla FM. Genetic ablation of tau mitigates cognitive impairment induced by type 1 diabetes. *Am J Pathol*. 2014;184(3):819–26.

49. de la Monte SM, Wands JR, Monte SM De, Wands JR. Review of insulin and insulin-like growth factor expression , signaling , and malfunction in the central nervous system: Relevance to Alzheimers disease. *Insulin*. 2005;7(1):45–61.
50. Ghasemi R, Zarifkar A, Rastegar K, Maghsoudi N, Moosavi M. Insulin protects against A β -induced spatial memory impairment, hippocampal apoptosis and MAPKs signaling disruption. *Neuropharmacology*. 2014;85:113–20.
51. Bird TD. Genetic aspects of Alzheimer disease. Vol. 10, *Genetics in Medicine*. 2008. p. 231–9.
52. Carmona S, Hardy J, Guerreiro R. Chapter 26 - The genetic landscape of Alzheimer disease. *Neurogenetics, Part II* [Internet]. 2018;148:395–408. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B97804444640765000260>
53. Wiseman FK, Al-Janabi T, Hardy J, Karmiloff-Smith A, Nizetic D, Tybulewicz VLJ, et al. A genetic cause of Alzheimer disease: mechanistic insights from Down syndrome. *Nat Rev Neurosci* [Internet]. 2015 Sep 5 [cited 2018 May 23];16(9):564–74. Available from: <http://www.nature.com/articles/nrn3983>
54. Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, et al. Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* [Internet]. 1995;375(6534):754–60. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/375754a0>
55. Cacace R, Sleegers K, Van Broeckhoven C. Molecular genetics of early-onset Alzheimer disease revisited. *Alzheimer's Dement* [Internet]. 2016;12(6):733–48. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jalz.2016.01.012>
56. Kamboh MI, Demirci FY, Wang X, Minster RL, Carrasquillo MM, Pankratz VS, et al. Genome-wide association study of Alzheimer's disease. *Transl Psychiatry*. 2012;2.
57. Liu CC, Kanekiyo T, Xu H, Bu G. Apolipoprotein e and Alzheimer disease: Risk, mechanisms and therapy. Vol. 9, *Nature Reviews Neurology*. 2013. p. 106–18.
58. Alzheimer's Association. 2015 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement* [Internet]. 2015;11(3):332–84. Available from: <http://dx.doi.org/>
59. Reitz C, Mayeux R. Alzheimer disease: Epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers. Vol. 88, *Biochemical Pharmacology*. 2014. p. 640–51.
60. Castellano JM, Kim J, Stewart FR, Jiang H, DeMattos RB, Patterson BW, et al. Human apoE isoforms differentially regulate brain amyloid- β peptide clearance. *Sci Transl Med*.

- 2011;3(89).
61. Braak H, Braak E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* [Internet]. 1991;82(4):239–59. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/BF00308809>
 62. Jack CR, Knopman DS, Jagust WJ, Petersen RC, Weiner MW, Aisen PS, et al. Tracking pathophysiological processes in Alzheimer’s disease: An updated hypothetical model of dynamic biomarkers. Vol. 12, *The Lancet Neurology*. 2013. p. 207–16.
 63. Thal DR, Rüb U, Schultz C, Sassin I, Ghebremedhin E, Del Tredici K, et al. Sequence of Abeta -Protein Deposition in the Human Medial Temporal Lobe. *J Neuropathol Exp Neurol* [Internet]. 2000;59(8):733–48. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10952063>
 64. Giménez-Llort L, Blázquez G, Cañete T, Johansson B, Oddo S, Tobeña A, et al. Modeling behavioral and neuronal symptoms of Alzheimer’s disease in mice: A role for intraneuronal amyloid. Vol. 31, *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 2007. p. 125–47.
 65. Van Dam D, De Deyn PP. Animal models in the drug discovery pipeline for Alzheimer’s disease. Vol. 164, *British Journal of Pharmacology*. 2011. p. 1285–300.
 66. LaFerla FM, Green KN. Animal models of Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012;2(11).
 67. Sabbagh JJ, Kinney JW, Cummings JL. Animal systems in the development of treatments for Alzheimer’s disease: challenges, methods, and implications. *Neurobiol Aging* [Internet]. 2013 Jan [cited 2018 May 23];34(1):169–83. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0197458012001765>
 68. Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kaye R, et al. Triple-transgenic model of Alzheimer’s Disease with plaques and tangles: Intracellular A β and synaptic dysfunction. *Neuron*. 2003;39(3):409–21.
 69. Mastrangelo MA, Bowers WJ. Detailed immunohistochemical characterization of temporal and spatial progression of Alzheimer’s disease-related pathologies in male triple-transgenic mice. *BMC Neurosci*. 2008;9:1–31.
 70. Sterniczuk R, Antle MC, Laferla FM, Dyck RH. Characterization of the 3xTg-AD mouse model of Alzheimer’s disease: Part 2. Behavioral and cognitive changes. *Brain Res*. 2010;1348:149–55.

71. Sterniczuk R, Dyck RH, Laferla FM, Antle MC. Characterization of the 3xTg-AD mouse model of Alzheimer's disease: Part 1. Circadian changes. *Brain Res.* 2010;1348:139–48.
72. IRIZARRY MC, MCNAMARA M, FEDORCHAK K, HSIAO K, HYMAN BT. APPSW Transgenic Mice Develop Age-related A β Deposits and Neuropil Abnormalities, but no Neuronal Loss in CA1. *J Neuropathol Exp Neurol* [Internet]. 1997;56(9):965–73. Available from: <https://academic.oup.com/jnen/article-lookup/doi/10.1097/00005072-199709000-00002>
73. Walsh RN, Cummins RA. The open-field test: A critical review. *Psychol Bull.* 1976;83(3):482–504.
74. Podhorna J, Brown RE. Strain differences in activity and emotionality do not account for differences in learning and memory performance between C57BL/6 and DBA/2 mice. *Genes, Brain Behav.* 2002;1(2):96–110.
75. Psotta L, Rockahr C, Gruss M, Kirches E, Braun K, Lessmann V, et al. Impact of an additional chronic BDNF reduction on learning performance in an Alzheimer mouse model. *Front Behav Neurosci.* 2015;9(March):1–10.
76. Brown RE, Corey SC, Moore a K. Differences in Measures of Exploration and Fear in Mhc-Congenic C57bl/6j and B6-H-2k Mice. *Behav Genet.* 1999;29(4):263–71.
77. Xifro X, Vidal-sancho L, Fournier A. Molecular Neurobiology Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) enhances hippocampal synaptic plasticity and improves memory performance in Huntington ' s disease. 2018;
78. Jankowsky JL, Zheng H. Practical considerations for choosing a mouse model of Alzheimer's disease. Vol. 12, *Molecular Neurodegeneration.* 2017.
79. St George-Hyslop PH. Genetic factors in the genesis of Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;924:1–7.
80. Witting W, Kwa IH, Eikelenboom P, Mirmiran M, Swaab DF. Alterations in the circadian rest-activity rhythm in aging and Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry.* 1990;27(6):563–72.
81. MESULAM M-M. A Plasticity-Based Theory of the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Ann N Y Acad Sci* [Internet]. 2006;924(1):42–52. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1749-6632.2000.tb05559.x>
82. Panegyres PK. The contribution of the study of neurodegenerative disorders to the understanding of human memory. *QJM* [Internet]. 2004;97(9):555–67. Available from:

- <http://www.qjmed.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/qjmed/hch096>
83. Vandenberghe R, Tournoy J. Cognitive aging and Alzheimer's disease. *Postgr Med J* [Internet]. 2005;81(956):343–52. Available from:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1743286&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 84. Webster SJ, Bachstetter AD, Nelson PT, Schmitt FA, Van Eldik LJ. Using mice to model Alzheimer's dementia: An overview of the clinical disease and the preclinical behavioral changes in 10 mouse models. *Front Genet*. 2014;5(APR).
 85. Barten DM, Cadelina GW, Hoque N, DeCarr LB, Guss VL, Yang L, et al. Tau Transgenic Mice as Models for Cerebrospinal Fluid Tau Biomarkers. Britton GB, Smith MA, Perry G, Sambamurti K, Jagannatha Rao KS, editors. *J Alzheimer's Dis* [Internet]. 2011 Apr 22 [cited 2018 May 29];24(s2):127–41. Available from:
<http://www.medra.org/servlet/aliasResolver?alias=iospress&doi=10.3233/JAD-2011-110161>
 86. Weintraub S, Wicklund AH, Salmon DP. The neuropsychological profile of Alzheimer disease. Vol. 2, Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine. 2012.
 87. Zola SM, Manzanares CM, Clopton P, Lah JJ, Levey AI. A behavioral task predicts conversion to mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Am J Alzheimers Dis Other Demen*. 2013;28(2):179–84.
 88. Stover KR, Campbell MA, Van Winssen CM, Brown RE. Analysis of motor function in 6-month-old male and female 3xTg-AD mice. *Behav Brain Res* [Internet]. 2015;281:16–23. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2014.11.046>
 89. Brown RE. Improving animal models for nervous system disorders. *Genes, Brain Behav* [Internet]. 2012 Aug [cited 2018 May 28];11(6):753–6. Available from:
<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1601-183X.2012.00808.x>
 90. Pettersson AF, Engardt M, Wahlund LO. Activity level and balance in subjects with mild Alzheimer's disease 6915. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2002;13(4):213–6.
 91. Buchman AS, Bennett DA. Loss of motor function in preclinical Alzheimer's disease. *Expert Rev Neurother*. 2011;11(5):665–76.
 92. Filali M, Lalonde R, Theriault P, Julien C, Calon F, Planel E. Cognitive and non-cognitive behaviors in the triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease expressing mutated APP, PS1, and Mapt (3xTg-AD). *Behav Brain Res*. 2012;234(2):334–42.

93. Arsenault D, Julien C, Tremblay C, Calon F. DHA improves cognition and prevents dysfunction of entorhinal cortex neurons in 3xTg-AD mice. *PLoS One*. 2011;6(2).
94. Nelson RL, Guo Z, Halagappa VM, Pearson M, Gray AJ, Matsuoka Y, et al. Prophylactic treatment with paroxetine ameliorates behavioral deficits and retards the development of amyloid and tau pathologies in 3xTgAD mice. *Exp Neurol*. 2007;205(1):166–76.
95. Pietropaolo S, Sun Y, Li R, Brana C, Feldon J, Yee BK. Limited impact of social isolation on Alzheimer-like symptoms in a triple transgenic mouse model. *Behav Neurosci* [Internet]. 2009;123(1):181–95. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19170443
96. Gulinello M, Gertner M, Mendoza G, Schoenfeld BP, Oddo S, LaFerla F, et al. Validation of a 2-day water maze protocol in mice. *Behav Brain Res*. 2009;196(2):220–7.
97. Baazaoui N, Iqbal K. Prevention of Amyloid- β and Tau Pathologies, Associated Neurodegeneration, and Cognitive Deficit by Early Treatment with a Neurotrophic Compound. *J Alzheimer's Dis*. 2017;58(1):215–30.
98. Baazaoui N, Flory M, Iqbal K. Synaptic Compensation as a Probable Cause of Prolonged Mild Cognitive Impairment in Alzheimer's Disease: Implications from a Transgenic Mouse Model of the Disease. *J Alzheimer's Dis*. 2017;56:1385–401.
99. Mukaetova-Ladinska EB, Garcia-Siera F, Hurt J, Gertz HJ, Xuereb JH, Hills R, et al. Staging of cytoskeletal and β -amyloid changes in human isocortex reveals biphasic synaptic protein response during progression of Alzheimer's disease. *Am J Pathol*. 2000;157(2):623–36.
100. Scheff SW, Price DA. Alzheimer's disease-related alterations in synaptic density: neocortex and hippocampus. *J Alzheimers Dis* [Internet]. 2006 [cited 2018 May 28];9(3 Suppl):101–15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16914849>
101. Billings LM, Oddo S, Green KN, McGaugh JL, LaFerla FM. Intraneuronal A β causes the onset of early Alzheimer's disease-related cognitive deficits in transgenic mice. *Neuron*. 2005;45(5):675–88.
102. Billings LM, Green KN, McGaugh JL, LaFerla FM. Learning Decreases A *56 and Tau Pathology and Ameliorates Behavioral Decline in 3xTg-AD Mice. *J Neurosci* [Internet]. 2007;27(4):751–61. Available from: <http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.4800-06.2007>

103. Clinton LK, Billings LM, Green KN, Caccamo A, Ngo J, Oddo S, et al. Age-dependent sexual dimorphism in cognition and stress response in the 3xTg-AD mice. *Neurobiol Dis.* 2007;28(1):76–82.
104. Wei W, Nguyen LN, Kessels HW, Hagiwara H, Sisodia S, Malinow R. Amyloid beta from axons and dendrites reduces local spine number and plasticity. *Nat Neurosci.* 2010;13(2):190–6.
105. Townsend M, Mehta T, Selkoe DJ. Soluble A β inhibits specific signal transduction cascades common to the insulin receptor pathway. *J Biol Chem.* 2007;282(46):33305–12.
106. Shankar GM, Li S, Mehta TH, Garcia-Munoz A, Shepardson NE, Smith I, et al. Amyloid- β protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat Med.* 2008;14(8):837–42.
107. Lesné S, Koh MT, Kotilinek L, Kaye R, Glabe CG, Yang A, et al. A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory. *Nature* [Internet]. 2006;440(7082):352–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16541076>
108. Isabel Arrieta-Cruz RG-J. The Role of Insulin Resistance and Glucose Metabolism Dysregulation in the Development of Alzheimer's Disease. *Rev Inves Clin.* 2016;68:53–8.
109. Grillo CA, Piroli GG, Lawrence RC, Wrihten SA, Green AJ, Wilson SP, et al. Hippocampal insulin resistance impairs spatial learning and synaptic plasticity. *Diabetes.* 2015;64(11):3927–36.
110. Barker GRI, Bird F, Alexander V, Warburton EC. Recognition Memory for Objects, Place, and Temporal Order: A Disconnection Analysis of the Role of the Medial Prefrontal Cortex and Perirhinal Cortex. *J Neurosci* [Internet]. 2007;27(11):2948–57. Available from: <http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.5289-06.2007>
111. Bermúdez-Rattoni F, Okuda S, Roozendaal B, McGaugh JL. Insular cortex is involved in consolidation of object recognition memory. *Learn Mem.* 2005;12(5):447–9.
112. Martinez-Coria H, Green KN, Billings LM, Kitazawa M, Albrecht M, Rammes G, et al. Memantine improves cognition and reduces Alzheimer's-like neuropathology in transgenic mice. *Am J Pathol.* 2010;176(2):870–80.
113. Stevens LM, Brown RE. Reference and working memory deficits in the 3xTg-AD mouse between 2 and 15-months of age: A cross-sectional study. *Behav Brain Res* [Internet]. 2015;278:496–505. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2014.10.033>

114. Suva D, Favre I, Kraftsik R, Esteban M, Lobrinus A, Miklossy J. Primary motor cortex involvement in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1999;58(11):1125–34.
115. Piccininni M, Di Carlo A, Baldereschi M, Zaccara G, Inzitari D. Behavioral and psychological symptoms in Alzheimer's disease: frequency and relationship with duration and severity of the disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* [Internet]. 2005;19(5–6):276–81. Available from: <http://pubmed>
116. Chung JA, Cummings JL. Neurobehavioral and neuropsychiatric symptoms in Alzheimer's disease: characteristics and treatment. *Neurol Clin* [Internet]. 2000 Nov 1 [cited 2018 May 29];18(4):829–46. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11072263>
117. Di Iulio F, Palmer K, Blundo C, Casini AR, Gianni W, Caltagirone C, et al. Occurrence of neuropsychiatric symptoms and psychiatric disorders in mild Alzheimer's disease and mild cognitive impairment subtypes. *Int Psychogeriatr*. 2010;22(4):629–40.
118. Drevets WC, Rubin EH. Psychotic symptoms and the longitudinal course of senile dementia of the Alzheimer type. *Biol Psychiatry*. 1989;25(1):39–48.
119. Levy ML, Cummings JL, Fairbanks LA, Bravi D, Calvani M, Carta A. Longitudinal assessment of symptoms of depression, agitation, and psychosis in 181 patients with Alzheimer's disease. *Am J Psychiatry*. 1996;153(11):1438–43.
120. Stern Y, Mayeux R, Sano M, Hauser WA, Bush T. Predictors of disease course in patients with probable Alzheimer's disease. *Neurology*. 1987;37(10).
121. Anand A, Shekhar A. Brain imaging studies in mood and anxiety disorders: special emphasis on the amygdala. *Ann N Y Acad Sci*. 2003;985:370–88.
122. Neuropsychiatric symptoms from the temporolimbic lobes. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* [Internet]. 1997 Aug 1 [cited 2018 May 29];9(3):429–38. Available from: <http://psychiatryonline.org/doi/abs/10.1176/jnp.9.3.429>
123. Shukla C, Bridges LR. Tau, β -amyloid and β -amyloid precursor protein distribution in the entorhinal-hippocampal alvear and perforant pathways in the Alzheimer's brain. *Neurosci Lett*. 2001;303(3):193–7.
124. Hyman BT, Van Hoesen GW, Damasio AR. Memory-related neural systems in Alzheimer's disease: an anatomic study. *Neurology* [Internet]. 1990;40(11):1721–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2234428>
125. España J, Giménez-Llort L, Valero J, Miñano A, Rábano A, Rodríguez-Alvarez J, et al.

Intraneuronal beta-amyloid accumulation in the amygdala enhances fear and anxiety in Alzheimer's disease transgenic mice. *Biol Psychiatry* [Internet]. 2010;67(6):513–21.
Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19664757>