



CONDUCTA SOCIAL, ANIDACIÓN Y RESPUESTA A ANTIPSICÓTICOS ATÍPICOS EN EL MODELO TRIPLE TRANSGÉNICO 3XTG-AD PARA LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Memoria presentada por VIRGINIA TORRES-LISTA para optar al grado de Doctor en Psiquiatría y Psicología Clínica.

Este trabajo se ha realizado bajo la dirección de la Dra. LYDIA GIMÉNEZ-LLORT en el Departamento de Psiquiatría y Medicina Legal de la Facultad de Medicina de la Universitat Autònoma de Barcelona, estando adscrito al programa de Doctorado en Psiquiatría y Psicología Clínica. Itinerario C: Neurociencias Cognitivas.

Virginia Torres-Lista

Dra. Lydia Giménez-Llort

Bellaterra, 2012.

Este trabajo ha sido realizado dentro del proyecto del Instituto Carlos III (ISC3 PI10/ 00283) titulado "Mortality risk in Alzheimer's disease associated to treatment with antipsychotics, risk factors and preventive/therapeutical strategies: Studies in triple-transgenic 3xTgAD mice for Alzheimer's disease" y de la Fundació La Marató de TV3 (062930) titulado "COUNTERACTING ALZHEIMER'S DISEASE PROGRESSION: Effects of early-environmental treatments on the triple-transgenic 3xTgAD mice".

Virginia Torres-Lista ha recibido una beca predoctoral de la Fundació La Marató de TV3.

A mi familia y amigos

Agradecimientos

Durante la realización de esta tesis doctoral, he recibido el apoyo de mi familia, directora de tesis, amigos, mis compañeros de laboratorio y por supuesto, la financiación de la Fundació de la Marató de TV3 y el Instituto Carlos III.

- ✓ Por esta razón, agradezco a mis padres Manuel e Isora y familia, por apoyarme en las grandes metas que me he propuesto para mi vida y sobretodo por contar con ellos en las circunstancias más confusas y por darme los mejores consejos para continuar trabajando por los proyectos de vida que me he propuesto.
- ✓ A mi hermana Ursula, por dedicar sus ratos libres para corregir y aclarar algunas dudas, por ser tan persistente, darme grandes consejos cuando más los necesité. Por su apoyo incondicional y por estar siempre viendo el lado positivo de las cosas.
- ✓ A la Dra. Lydia Giménez Llord, por darme la oportunidad de trabajar con ella en su grupo de investigación, por tener la paciencia y dedicación de orientarme hacer cada día mejor mi trabajo. Agradezco su apoyo en esos grandes momentos de mi vida, como también por enseñarme a entender la metáfora del río y la orilla ya que esto me ha ayudado para la culminación de la presente tesis.
- ✓ A Daniel, por apoyarme en todos mis proyectos, que ahora también compartimos juntos como una gran aventura. Por tener paciencia cuando salía tarde de la facultad, por corregir los detalles más complejos y por intentar siempre robarme una sonrisa.
- ✓ A mis compañeros de laboratorio, durante todo este tiempo nuestro grupo ha sido muy diverso culturalmente, donde cada uno ha aprendido del otro y

por supuesto hemos compartido grandes momentos de alegrías. En particular, agradezco a Paula por ayudarme a adaptarme a la dinámica del grupo; Ismael por cuidarme algunas veces mis ratones cuando estaba en congresos y por ser un gran compañero a la hora de hacer estabulario, Denise por ser una muy buena compañera de turismo y su gran apoyo a pesar de la distancia; Efosa por participar tanto en proyectos científicos como humanitarios y Raquel y Aida por ayudarme durante estos últimos meses con las funciones del estabulario y por su gran optimismo para realizar las cosas.

- ✓ A mis amigos, por tener siempre palabras cargadas de motivación y alegrías. A los que están en el extranjero, a pesar de la distancia gracias por este gran apoyo en cada una de mis metas.
- ✓ A la Fundació de la Marató de TV3 y el Instituto Carlos III por su financiación, que gracias a ellos este trabajo se pudo realizar para aportar nuevos hallazgos en el área multidisciplinaria.
- ✓ Finalmente, agradezco a los grandes protagonistas de esta tesis doctoral que son los ratones, gracias a ellos la investigación básica aporta cada día mayor información en la búsqueda de nuevas aportaciones terapéuticas para la Enfermedad de Alzheimer.

La investigación es un largo y complejo camino, que implica mucha fortaleza para afrontar tanto los logros como las dificultades y como dijo el Dr. Humberto Fernández Morán 'Ciencia es ver todo lo que todo el mundo ha visto, pero pensar lo que nadie ha pensado'... 'Un solo hombre puede hacer mucho, pero se distinguirá cuando dé la mano en equipo, cuando estimule al otro, cuando haya respeto'...'La vida es un eterno aprendizaje'.

Virginia Torres-Lista

ABREVIATURAS

Abreviaturas más utilizadas en este trabajo.

NTg	Ratones no-transgénicos.
3xTg-AD	Ratones triple transgénicos para la Enfermedad de Alzheimer.
(s)	Grupo experimental con solución salina.
(r)	Grupo experimental con risperidona.
Fase 1	Fase experimental: estado basal, sin tratamiento.
Fase 2	Fase experimental: Dosis de risperidona 0.05 mg/Kg.
Fase 3	Fase experimental: Dosis de risperidona 0.1 mg/Kg.
Fase 4	Fase experimental: Dosis de 0.1 mg/Kg. Sin evaluación conductual.
Fase 5	Fase experimental: sin tratamiento.
β A	Péptido beta-amiloide.
ACT	Actimetría: <i>Actimeter</i> .
ACV	Accidente cerebrovascular.
ApoE	Apolipoproteína E
APP	Proteína precursora amiloidea.
ASS	Agregación social durante la fase del sueño: <i>Home cage sleeping behaviour</i> .
AVD	Actividad de la vida diaria.
CA	Conducta de anidar o construcción del nido: <i>Nesting behaviour</i> .
CT	Prueba de las esquinas o neofobia: <i>Corner Test</i> .
DA	Dopamina.
DLB	Caja de luz/oscuridad: <i>Dark/light box</i> .
DSM-IV TR	Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales.
EA	Enfermedad de Alzheimer: <i>Alzheimer's Disease</i> .
ED	Efecto Dalila o <i>barbering</i> .
EPM	Laberinto elevado en cruz: <i>Elevated plus maze</i> .
ETM	Laberinto en T elevado.
FDA	Administración de alimentos y medicamentos, del departamento de salud y servicio humano de los Estados Unidos: <i>U.S. Food and Drug Administration, United States Department of Health and Human Services</i> .
fEPSP	Potencial excitatorio postsináptico: <i>Field excitatory postsynaptic potentials</i> .
FST	Test de natación forzada: <i>Forced swimming test</i> .
IPGTT	Test Intraperitoneal de tolerancia a la glucosa:

IS	<i>Intraperitoneal glucose tolerance Test.</i>
LTP	Aislamiento social: <i>Social isolation.</i>
MBT	Potenciación a largo plazo: <i>Long-term potentiation.</i>
MMSE	Test de enterramiento de mármoles: <i>Marble burying test.</i>
MWM	Mini examen del estado mental.
OF	Laberinto acuático de Morris: <i>Morris water maze.</i>
PCP	Prueba del campo abierto: <i>Open Field test.</i>
	Fenciclidina.
	(Contracción del nombre químico fenilciclohexilpiperidina)
PFC	Corteza prefrontal.
PS1	Gen de la presenilina 1
PS2	Gen de la presenilina 2
RAM	Laberinto radial
SCPD	Síntomas conductuales y psicológicos de la demencia.
TIS	Test de interacción social. <i>Social interaction test.</i>
TM	Laberinto en T: <i>T maze.</i>
TTD	Test de tubo-dominancia: <i>Tube dominance test.</i>

ÍNDICE DE CONTENIDO

Resumen	23
Introducción	27
Enfermedad de Alzheimer y otras demencias	27
Heterogeneidad de los síntomas conductuales y neuropsiquiátricos en la enfermedad de Alzheimer	29
Tratamiento con antipsicóticos en la enfermedad de Alzheimer	30
Modelos animales en la enfermedad de Alzheimer	34
Alteraciones conductuales que afecta los patrones sociales	40
Test para el estudio de las conductas sociales	44
Test de interacción social (TIS)	44
Test de tubo de dominancia (TTD)	45
Efecto Dalila (ED)	45
Agregación social durante la fase de sueño (ASS)	46
Conducta de anidación o construcción del nido	46
Conducta social inducida (IS)	49
Test para el estudio de la emotividad	49
Prueba del campo abierto (OF)	50
Prueba del enterramiento de mármoles (MBT)	51
Prueba de natación forzada (FST).....	51
Test para el estudio del aprendizaje y memoria	52
Laberinto acuático de Morris (MWM)	52
Laberinto en T (TM)	53
Objetivos	57
Estudio 1: Caracterización de las conducta sociales en ratones	
3xTg-AD	59
Materiales y métodos	61
Métodos: aspectos generales	61
Diseño experimental	62

Agregación social durante la fase de sueño (ASS)	62
Test de interacción social en un ambiente nuevo (TIS)	63
Efecto Dalila o <i>Barbering</i> (ED)	63
Test del tubo-dominancia (TDD)	64
Análisis estadístico	64
Resultados del estudio 1	65
Experimento 1	65
Agregación social durante la fase de sueño (ASS)	65
Test de interacción social en un ambiente nuevo (TIS)	66
Efecto Dalila o <i>Barbering</i> (ED)	70
Experimento 2	71
Test del tubo-dominancia (TTD)	71
Discusión del estudio 1.....	72
Conclusiones del estudio 1	76
Estudio 2: Caracterización de la conducta de anidación en ratones	
3xTg-AD	77
Materiales y métodos	79
Sujetos experimentales.....	79
Diseño experimental	79
Escala de Deacon	80
Análisis estadístico	81
Resultados del estudio 2	82
1. Diseño y evaluación de la conducta de anidación	82
1.1. Experimento 1. Conducta de anidación o construcción del nido en estructuras parentales	82
1.2. Experimento 2. Conducta de anidación o construcción del nido en aislamiento social	85
Discusión del estudio 2.....	90
Conclusiones del estudio 2	95
Estudio 3: Caracterización del perfil cognitivo y tipo SCPD de los ratones 3xTg-AD y NTg a los 12 meses de edad	97

Materiales y métodos	99
Sujetos experimentales.....	99
Diseño experimental y protocolos	99
Capacidad exploratoria y conducta de ansiedad	100
Prueba de las esquinas (CT)	100
Prueba del campo abierto (OF)	101
Actividad circadiana	102
Actimetría de 24h (ACT)	102
Desesperanza conductual	102
Test de natación forzada (FST)	102
Conducta social	103
Test de interacción social en un ambiente nuevo (TIS)	103
Aprendizaje y memoria	103
Laberinto en T (TM)	103
Laberinto acuático de Morris (MWM)	104
Conducta de enterramiento de mármoles	105
Test de enterramiento de mármoles (MBT)	105
Test intraperitoneal de tolerancia a la glucosa (IPGTT)	105
Peso corporal	106
Análisis estadístico	106
Resultados del estudio 3	107
Capacidad exploratoria y conducta de ansiedad	107
Prueba de las esquinas (CT)	109
Prueba del campo abierto (OF)	110
Actividad circadiana	113
Actimetría de 24h (ACT)	113
Desesperanza conductual	117
Test de natación forzada (FST)	117
Conducta social	121
Test de interacción social en un ambiente nuevo (TIS)	121
Conductas sociales	124

Conductas no-sociales	126
Aprendizaje y memoria	126
Laberinto en T (TM)	126
Laberinto acuático de Morris (MWM)	129
Conducta de enterramiento de mármoles	132
Test de enterramiento de mármoles (MBT)	132
Test intraperitoneal de tolerancia a la glucosa (IPGTT)	133
Discusión del estudio 3	135
Conclusiones del estudio 3	146
Estudio 3: Vulnerabilidad inducida por el tratamiento crónico con el antipsicótico atípico risperidona en ratones 3xTg-AD y NTg	149
Materiales y métodos	150
Sujetos experimentales.....	150
Diseño experimental	150
Tratamiento farmacológico con antipsicótico atípico risperidona	151
Fase 1. Caracterización del perfil cognitivo y SCPD-like de los ratones 3xTg-AD a los 12 meses de edad	152
Fase 2. Tratamiento con risperidona a una dosis de 0.05 mg/kg	152
Fase 3. Evaluación de los efectos a largo plazo del tratamiento en las variables vitales y pruebas conductuales en los ratones 3xTg-AD y NTg. Tratamiento con risperidona a una dosis de 0.1 mg/kg	153
Fase 4. Seguimiento del tratamiento con risperidona en los grupos de ratones 3xTg-AD y NTg a una dosis de 0.1 mg/kg	153
Fase 5. Seguimiento de las variables vitales desde el inicio del proceso experimental hasta el final de la vida de los ratones 3xTg-AD y NTg	153
Curva de peso	154
Curva de supervivencia	154
Análisis estadístico	154
Resultados del estudio 4	154
Fase 2. Tratamiento con risperidona a una dosis de 0.05 mg/kg	154

Prueba de las esquinas (CT)	155
Laberinto en T (TM)	158
Fase 3. Evaluación de los efectos a largo plazo del tratamiento en las variables vitales y pruebas conductuales en los ratones 3xTg-AD y NTg. Tratamiento con risperidona a una dosis de 0.1 mg/kg	160
Prueba de las esquinas (CT)	160
Prueba del campo abierto (OF)	164
Test de interacción social en un ambiente nuevo (TIS)	170
Laberinto en T (TM)	178
Laberinto acuático de Morris (MWM)	180
Test de enterramiento de mármoles (MBT)	186
Estado basal de la glucosa en sangre.....	189
Fase 5. Seguimiento de las variables vitales desde el inicio del proceso experimental hasta el final de la vida de los ratones 3xTg-AD y NTg	190
Pesos	190
Curva de supervivencia	195
Discusión del estudio 4	202
Conclusiones del estudio 4	220
Aportaciones de la tesis y conclusiones generales	225
Referencias Bibliográficas	231
Anexos	267

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

TABLAS

Tabla I. Nuevas terminologías	29
Tabla II. Resumen de los modelos transgénicos más utilizados	36
Tabla III. Resumen de los modelos animales (ratones) con estudios antipsicóticos	39
Tabla IV. Principales estudios de las conductas sociales, modelado de trastornos neurológicos, psiquiátricos y de otras enfermedades...	42
Tabla V. Principales estudios de la conducta de anidación	48
Tabla 1. Diseño experimental	62
Tabla 2. Agregación social durante la fase de sueño	65
Tabla 3. Test de interacción social	68
Tabla 4. Efecto Dalila o <i>Barbering</i>	71
Tabla 5. Diseño experimental	79
Tabla 6. Conducta de anidación en estructuras parentales	85
Tabla 7. Caracterización de la conducta de anidación en aislamiento social..	88
Tabla 8. Latencia de contacto con el material de 'algodón'.....	90
Tabla 9. Batería de tests conductuales y tolerancia a la glucosa	100
Tabla 10. Capacidad exploratoria y conducta de ansiedad	107
Tabla 11. Actividad circadiana	115
Tabla 12. Desesperanza conductual	118
Tabla 13. Test de interacción social	122
Tabla 14. Memoria de trabajo	127
Tabla 15. Diseño experimental	150
Tabla 16. Fase 2. Prueba de las esquinas y Laberinto en T.....	157
Tabla 17. Fase 3.Prueba de las esquinas	161
Tabla 18. Fase 3. Prueba del campo abierto	167
Tabla 19. Fase 3. Conducta social y no-sociales	172

Tabla 20. Fase 3. Prueba del Laberinto en T	179
Tabla 21. Fase 3. Laberinto acúatico de Morris.....	183
Tabla 22. Fase 3. Test de enterramiento de mármoles	188
Tabla 23. Fase 3. Estado basal de la glucosa	189

FIGURAS

Figura I. Test conductuales para evaluar la memoria en modelos de animales para la enfermedad de Alzheimer	37
Figura 1. Conducta Social	67
Figura 2. Conductas no-sociales	69
Figura 3. Test del Tubo-dominancia	72
Figura 4. Construcción del nido en estructuras parentales	82
Figura 5. Construcción del nido en aislamiento social	86
Figura 6. Prueba de Neofobia	108
Figura 7. Prueba del campo abierto	111
Figura 8. Prueba de Actimetría	114
Figura 9. Prueba de natación forzada	119
Figura 10. Conducta Social	123
Figura 11. Conductas no-sociales	125
Figura 12. Prueba del laberinto en T	128
Figura 13. Laberinto acuático de Morris	130
Figura 14. Test de enterramiento de mármoles	133
Figura 15. Test intraperitoneal de tolerancia a la glucosa 'IPGTT'.....	134
Figura 16. Diseño experimental	151
Figura 17. Prueba de Neofobia	155
Figura 18. Prueba del laberinto en T	158
Figura 19. Prueba de las esquinas	162
Figura 20. Prueba del campo abierto	164
Figura 21. Conducta Social	170
Figura 22. Conductas no-sociales	176
Figura 23. Prueba del laberinto en T	178
Figura 24. Laberinto acuático de Morris	181
Figura 25. Test de enterramiento de mármoles	186
Figura 26. Estado basal de la glucosa	189
Figura 27. Pesos: Fase 1, caracterización basal	191

Figura 28. Pesos: Fase 2 con tratamiento de risperidona a una dosis de 0.05 mg/kg	192
Figura 29. Pesos: Fase 3 Tratamiento con risperidona a una dosis de 0.1 mg/kg	193
Figura 30. Pesos: inmediatamente después de la defunción	194
Figura 31. Porcentaje de supervivencia	195
Figura 32. Supervivencia promedio	196
Figura 33. Curva de supervivencia	200
Figura 34. Curva de supervivencia	201

Resumen

A pesar de que la demencia es el síntoma característico de la enfermedad de Alzheimer, los síntomas conductuales y psicológicos asociados a ella (SCPD) y las alteraciones en las actividades de la vida diaria (AVD) son problemas comunes en los pacientes que sufren la enfermedad. SCPD y AVD causan angustia y discapacidad de forma considerable en los enfermos, generan síndromes relacionados con estrés en sus cuidadores y son considerados los principales causantes de la institucionalización temprana de los pacientes. Modelar a nivel experimental este amplio espectro de síntomas es difícil, pero en nuestro laboratorio hemos ido demostrando que el ratón triple-transgénico 3xTg-AD creado por el laboratorio de LaFerla (UCI, USA) no sólo reproduce los déficits cognitivos sino también los síntomas de tipo SCPD.

La presente tesis doctoral contribuye a esta *caracterización conductual del modelo animal 3xTg-AD*, en ambos géneros y en distintas fases de la enfermedad, y de forma comparativa con sus respectivos controles NTg, describiendo su comportamiento en distintas pruebas que evalúan la *conducta social* y las actividades de la vida diaria como la *conducta de nido*. En la mayoría de las conductas sociales estudiadas se observan los efectos de los factores 'género', 'genotipo' y la interacción 'género x genotipo'. Así, aunque la *agregación social* durante la fase de sueño fue similar, el patrón de *interacción social* difirió de forma característica, según genotipo y género, en las variables relacionadas con la conducta de *cola vibrante*. Entre las conductas no-sociales, la actividad horizontal y las conductas de acicalamiento y enterramiento fueron las que mostraron principalmente efecto género y genotipo, debido principalmente a los patrones exhibidos por las hembras 3xTg-AD. El efecto *Dalila* o *barbering* sólo se observó en los ratones hembras NTg y no se encontró relacionado con la conducta evaluada en el *test de tubo-dominancia*. Por último, la *conducta de anidación* se halló alterada tanto en las estructuras parentales como en animales aislados, pero está condicionada por aspectos

metodológicos como el tipo de material con el que se estudia. El conjunto de estos resultados indican que los ratones 3xTg-AD presentan deficiencias específicas, más acusadas en el género femenino, que hacen que este modelo animal y estas pruebas conductuales, en particular, sean útiles para desarrollar y evaluar, a nivel experimental, estrategias preventivas y terapéuticas beneficiosas para la enfermedad así como para evaluar factores de riesgo.

Asimismo, se estudió el uso crónico de la risperidona (0.1mg/kg, s.c.) como antipsicótico atípico en machos 3xTg-AD iniciado a los 12 meses de edad o fases avanzadas de la enfermedad y en comparación a sus controles NTg. Los resultados mostraron diferencias de 6 meses en la esperanza de vida media y de hasta 12 meses en la supervivencia máxima entre los ratones macho 3xTg-AD y sus controles. Además, permitieron modelar el aumento del riesgo de mortalidad inducido por el tratamiento crónico con antipsicóticos atípicos como la risperidona observados a nivel clínico en pacientes humanos. Así, a pesar de que la risperidona permitió modificar las alteraciones en conducta social y la conducta de enterramiento de mármoles mostradas por los ratones 3xTg-AD, ejerció efectos negativos reduciendo la actividad exploratoria vertical y horizontal en los tests, y lo que es más preocupante, comprometió la supervivencia máxima de los ratones 3xTg-AD reduciéndola en 2 meses. De la misma manera, la risperidona ejerció efectos deletéreos en los animales NTg especialmente al inicio de su vejez (16-21 meses) y reduciendo su supervivencia máxima 8 meses, modulando así, a nivel experimental, la ventana de vulnerabilidad temprana descrita para los efectos adversos de la risperidona en ancianos tratados con antipsicóticos atípicos.

Palabras clave: 3xTgAD, SCPD, AVD, riesgo de mortalidad, risperidona, antipsicótico atípico.

Introducción

Enfermedad de Alzheimer y otras demencias

Durante las últimas décadas los procesos neurodegenerativos y las demencias, en particular, han despertado un especial interés, tanto por parte de la investigación básica como de la clínica. El DSM-IV-TR (APA, 2002) distingue distintos tipos de demencias como: demencia tipo Alzheimer (EA), demencia vascular, demencia debido a enfermedad por VIH, demencia debido a traumatismo craneal, demencia debido a enfermedad de Parkinson, demencia debido a enfermedad de Huntington, demencia debido a enfermedad de Pick, demencia debido a enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, demencia debido a otras enfermedades médicas, demencia inducida por el consumo persistente de sustancia y demencia debido a etiologías múltiples.

En este trabajo de investigación estudiaremos la demencia de tipo Alzheimer, un trastorno neurodegenerativo que en la actualidad afecta a casi el 2% de la población en los países industrializados. El riesgo de padecer la Enfermedad de Alzheimer (EA) aumenta drásticamente en los individuos mayores de 70 años (revisado por Mattson, 2004 y Di Carlo *et al.*, 2012), siendo la edad el principal factor de riesgo descrito. El 95% de los casos esporádicos (de aparición temprana) sugieren que un bajo nivel de escolaridad, antecedentes de traumatismo craneal, consumo de dietas altas en grasas, hipertensión arterial, diabetes, depresión, alcohol y un estilo de vida sedentario puede aumentar el riesgo de EA (revisado por Mattson, 2004 y Campdelacreu, 2012), mientras que menos del 5% de los casos tiene una base genética conocida Alzheimer de tipo familiar, con mutaciones en los genes de APP y/o PS1, presinilina (de inicio temprano) (Di Carlo *et al.*, 2012). Sin embargo, análisis genéticos sugieren que existen muchos genes que generan susceptibilidad a la EA, como es el caso de la apolipoproteína E (cromosoma 19) y un segundo locus de susceptibilidad para la EA de inicio tardío se ha localizado en el cromosoma 10, pero el gen responsable no ha sido establecido (Selkoe, 2001; Mattson, 2004 y Wolk *et al.*, 2010). Recientemente, gracias a los avances en el estudio del genoma humano

se han detectado nuevos genes relacionados con la EA como es el caso de las funciones del sistema inmune (genes implicados: CLU, CR1, ABCA7, MS4A clúster, CD33 y EPHA1), el metabolismo del colesterol (APOE, CLU y ABCA7) y la disfunción sináptica y los procesos de la membrana celular (PICALM, BIN1, CD33, CD2AP y EPHA1) (revisado por Alves *et al.*, 2012 y Schellenberg *et al.*, 2012).

La EA se diagnostica *postmortem*, por presencia de lesiones neuropatológicas características bien conocidas como la acumulación extracelular de la proteína beta-amiloide (β A) y de ovillos de proteína tau hiperfosforilada (Selkoe, 2000). A nivel neuronal se caracteriza por una degeneración sináptica y muerte neuronal en regiones como los lóbulos frontales y temporales, estructuras límbicas, paralímbicas y neocorticales. La deficiencia en neurotransmisión de los sistemas colinérgico, serotoninérgico y noradrenérgico contribuye a los cambios patológicos subyacentes de la enfermedad (revisado por Cummings, 2000; Mattson, 2004 y Di Carlo *et al.*, 2012).

La Enfermedad de Alzheimer (EA) se manifiesta clínicamente con un deterioro progresivo de la memoria, pérdida visoespacial, afasia, apraxia, agnosia, alteraciones de las funciones ejecutivas y cambios neuropsiquiátricos que altera las funciones sociales y actividades de la vida diaria (revisado por Cummings, 2000 y Dubois *et al.*, 2010).

Los avances recientes en el uso de biomarcadores fiables en la EA, que proporcionan evidencia *in vivo* de la enfermedad, han estimulado el desarrollo de nuevos criterios de investigación que reconceptualizarán el diagnóstico en un patrón específico de cambios cognitivos y estructurales / biológico que evidencia la patología de Alzheimer (revisado por Dubois *et al.*, 2010).

Los nuevos términos propuestos para clasificar la enfermedad de Alzheimer se detallan en la Tabla I (revisado por Dubois *et al.*, 2010).

Tabla I. Nuevas terminologías para la enfermedad de Alzheimer

	<i>EA diagnóstico</i>	<i>Presencia de deterioro en las pruebas de memoria</i>	<i>Las pruebas de biomarcadores in vivo</i>	<i>Requisitos adicionales</i>
EA típica.	Sí	Necesario	Necesario	Ninguno.
AD atípica.	Sí	No se requiere	Necesario	Presentación clínica específica.
EA prodrómica.	Sí	Necesario	Necesario	La ausencia de demencia.
EA demencia.	Sí	Necesario	Necesario	Presencia de demencia.
EA mixta.	Sí	Necesario	Necesario	Evidencia de los trastornos comórbidos.
<u>Preclínica EA:</u>				
Asintomática en situación de riesgo para la EA.	No	No está presente	Necesario	Ausencia de síntomas de EA.
EA pre-sintomático.	No	No está presente	No se requiere	Ausencia de síntomas de EA y la presencia de la mutación monogénica EA.
El deterioro cognitivo leve.	No	No se requiere	No se requiere	La ausencia de síntomas o biomarcadores específicos para la EA.

Heterogeneidad de los síntomas conductuales y neuropsiquiátricos en la enfermedad de Alzheimer

Las alteraciones conductuales y los síntomas neuropsiquiátricos conocidos como "Síntomas conductuales y psicológicos de la demencia (SCPD)", ocasionalmente pueden anunciar la aparición de EA y se encuentran presentes en el 90% de las personas con EA a medida que avanza la enfermedad. Muchos individuos con EA muestran cambios de personalidad, apatía, así como un aumento de la irritabilidad. La depresión se encuentra presente entre un 25-50% de los pacientes, la desinhibición entre un 20-35%, las ideas delirantes entre un 15-50%, las alucinaciones entre 10-25%, agitación en un 50-70%, la ansiedad y/o fobias en un 30-50%, la agresión en un 25%, y la desinhibición sexual en un 5-10%. Algunos pacientes muestran también comportamientos

desinhibidos o desprecio por las normas convencionales que regulan el comportamiento social, deambulación, trastornos del ciclo circadiano y trastornos en la alimentación (Cummings, 2000; APA, 2002 y Flirski *et al.*, 2011).

La mayor parte de estos síntomas tienen un fuerte impacto en las actividades de la vida social del individuo alejándolo del patrón de normalidad ya sea por exceso o por ausencia de interacción. Así tenemos por un lado, alteraciones conductuales que cursan con irritabilidad, disforia, paranoias, fobias, agresión, desinhibición sexual, desacato de normas sociales y en el rango de síntomas opuestos la apatía, conducta depresiva, falta de interés en el entorno, aislamiento social y pérdida de motivación para mejorar o trabajar (Chung *et al.*, 2000). El declive cognitivo característico de la demencia está asociado al aumento de la vulnerabilidad social en humanos que en ocasiones conlleva a la muerte (Andrew *et al.*, 2010).

La mayoría de los estudios en pacientes de Alzheimer se centran en los síntomas propiamente dichos, agrupados en clústeres, mientras que su trascendencia alterando la vida social normal del individuo se observa como consecuencia de ellos, más que como punto de interés por sí mismo. En la investigación básica no es así, el estudio de las conductas sociales y de los cambios observables en las actividades de la vida diaria van más allá de ser una herramienta importante para medir alteraciones en otros aspectos cognitivos.

Tratamientos con antipsicóticos en la enfermedad de Alzheimer

Los síntomas neuropsiquiátricos presentan diversas repercusiones clínicas en los pacientes con enfermedad de Alzheimer, como es el caso específico de la psicosis, la agitación y la agresividad. La prevalencia de los delirios en pacientes con EA se encuentra entre el 9-63%, el de las alucinaciones entre 4-

41%, la tasa de agresividad está entre 11-46% y la agitación tiene un índice de prevalencia aún mayor entre 20-80% (Jeste *et al.*, 2008). La mayoría de estos síntomas disminuyen la calidad de vida de los pacientes y particularmente la psicosis es asociada con un rápido deterioro cognitivo (revisado por Cummings, 2000 y Kalman *et al.*, 2008).

Durante la última década, los más recientes fármacos antipsicóticos atípicos que han sido aprobados por la FDA son la risperidona en 1993, la olanzapina en 1996, la quetiapina en 1997, la ziprasidona en 2001 y el aripiprazol en 2002. Estos antipsicóticos atípicos han remplazado a los antipsicóticos de primera generación como el haloperidol y la tioridazina (Schneider *et al.*, 2005 y Jeste *et al.*, 2008).

En este trabajo nos centraremos en la risperidona, es uno de los antipsicóticos atípicos más utilizados y coadministrado con diferentes tipos de fármacos. Los antipsicóticos atípicos se utilizan como primera línea de enfoque farmacológico para el tratamiento de los síntomas neuropsiquiátricos en la enfermedad de Alzheimer (Ballard *et al.*, 2009).

La risperidona, es un antagonista selectivo monoaminérgico, que presenta una alta afinidad con los receptores serotoninérgicos 5-HT₂ y dopaminérgicos D₂, se une también a los receptores α₁ adrenérgicos y con menor afinidad a los receptores H₁ histaminérgicos y α₂ adrenérgicos. La risperidona es principalmente metabolizada por la enzima citocromo P-450 2D6 (CYP2D6), que tiene más de 20 polimorfismos genéticos y su principal metabolito activo 9-OH risperidona y menor proporción N-desalquilación y 7-hidroxilación (Leysen, *et al.* 1988; Mannens *et al.*, 1993 y Matsubara *et al.*, 2002). Ha sido aprobada por la FDA para el tratamiento de la esquizofrenia (síntomas positivos y negativos), trastornos bipolares y autismo. Además se utiliza en la demencia, depresión, trastornos obsesivos-compulsivos, trastornos de personalidad y déficit de atención e hiperactividad (Katz *et al.*, 2007; Shekelle *et al.*, 2007 y

Rodríguez-Antona *et al.*, 2009). En adultos la risperidona tiene una absorción rápida y completa tras la administración oral observándose efectos a las 2,5h y se mantiene hasta las 24,7 horas, se metaboliza principalmente en el hígado excretándose en una proporción menor 1% en forma inalterada por las heces (Mannenst *et al.*, 1993 y Zhou *et al.*, 2006).

Este fármaco presenta un efecto moderado pero significativo en el tratamiento a corto plazo (> 6-12 semanas) para la agresión, pero se encuentra limitado en terapia de largo plazo y para los síntomas de agitación los resultados no se encuentran bien establecidos. Además, aumentan las preocupaciones sobre los resultados adversos con estos tratamientos, incluyendo accidentes cerebrovasculares y la muerte (Ballard *et al.*, 2009).

En abril de 2005, La administración de alimentos y medicamentos, del departamento de salud y servicio humano de los Estados Unidos en inglés U.S. *Food and Drug Administration (FDA)* emitió la siguiente advertencia para todos los antipsicóticos atípicos en función de sus evaluaciones:

“La FDA informó a los profesionales sanitarios y al público sobre el aumento del riesgo de mortalidad en pacientes ancianos que recibieron fármacos antipsicóticos atípicos para el tratamiento de psicosis relacionada con demencia. Los análisis de 17 ensayos controlados con placebo que incluyeron a 5377 pacientes de edad avanzada con trastornos de conducta asociados a demencia reveló un riesgo de muerte en los pacientes tratados con el fármaco de entre 1,6 y 1,7 veces la observada en pacientes tratados con placebo. La tasa de mortalidad en los pacientes tratados con fármaco era aproximadamente 4,5%, en comparación con una velocidad de aproximadamente 2,6% en el grupo placebo. Aunque las causas de muerte fueron variadas, la mayoría de las muertes parecieron ser de naturaleza cardiovascular (por ejemplo, insuficiencia cardíaca, muerte súbita) o infecciosa (neumonía)”.

En base a este análisis, la FDA solicitó que los fabricantes de los fármacos antipsicóticos atípicos incluyeran una información acerca de este riesgo en el prospecto del medicamento (Jeste *et al.*, 2008).

Estas alertas trajeron una diversidad de opiniones en la comunidad científica. Algunos autores consideraron las advertencias sobre los antipsicóticos atípicos como alarmantes y potencialmente perjudiciales para los pacientes con demencia, mientras otros estaban preocupados porque no había pruebas claras para apoyar un mayor beneficio en relación a los antipsicóticos atípicos con respecto a los convencionales (Trifiro *et al.*, 2009).

Esta diversidad de opiniones se puede observar en los estudios de los trastornos del ciclo circadiano donde los pacientes con demencia al cabo de un tratamiento de 12 semanas a una dosis de 1,49 mg/día de risperidona reportaron mejoras en las horas de sueño total, horas de vigilia en la cama, insomnio y otras variables relacionadas con el sueño (Durán, JC., et al., 2005). Otros estudios han indicado que en los pacientes ancianos con demencia a una dosis baja de risperidona 0,5 y 1 mg fue bien tolerada y se asocia con reducciones en los SCPD, en particular, la agitación, agresividad, irritabilidad, delirios, trastornos del sueño, ansiedad y fobias. A pesar de la eficacia en la reducción de diversos síntomas adversos la risperidona y la olanzapina no deberían usarse de forma rutinaria para el tratamiento de la agresividad y la psicosis en pacientes con demencia (Onor *et al.*, 2007).

Otros estudios han indicado que la risperidona y la olanzapina incrementan el riesgo de mortalidad en pacientes de edad avanzada con demencia con un mayor riesgo de la segunda sobre la primera (Vilalta-Franch *et al.*, 2008). Asimismo, los riesgos de mortalidad se incrementan con las dosis altas de antipsicótico atípico y las causas de mortalidad son accidentes cerebrovasculares, enfermedades respiratorias y desorden circulatorios (Huybrechts *et al.*, 2012) en comparación con las personas que recibieron placebo (Trifiro *et al.*, 2009).

Los riesgos cerebrovasculares (ACV) se observan especialmente durante las primeras semanas de tratamiento, este riesgo disminuye con el tiempo y se normaliza después de 3 meses de tratamiento (Kleijer *et al.*, 2009).

En la actualidad, en diversos hospitales y/o geriátricos se siguen utilizando antipsicóticos atípicos para los síntomas conductuales y psicológicos de la demencia, a pesar de que las personas ancianas son más sensibles a sus efectos secundarios que los adultos jóvenes y de mediana edad, en parte por la interacción de los cambios ocasionados por la edad y la sensibilidad farmacológica ante los tratamientos antipsicóticos (Salzman *et al.*, 2008).

Debido a la variedad de resultados y en la imposibilidad ética de realizar nuevos estudios clínicos en humanos es importante modelar las respuestas farmacológicas de los antipsicóticos en animales y poder estudiar los cambios de los síntomas conductuales y psicológicos de la demencia (SCPD).

Modelos animales en la Enfermedad de Alzheimer

En épocas recientes, gracias a los avances de los distintos frentes de investigadores de la neurobiología, la farmacología, la genética molecular y la utilización de modelos animales en psiquiatría han contribuido al gran vuelco conceptual de esa área de conocimiento. Los ensayos con animales permiten incursiones medicamentosas, quirúrgicas o toxicológicas que están vedadas a la experimentación humana y expanden, con ello, el banco de pruebas accesibles.

A nivel de investigación básica, el modelado en ratones transgénicos de las características de la pérdida de la memoria en la EA ha sido un desafío debido que los primeros modelos no manifestaban los síntomas cognitivos de la enfermedad, y la validez de estos modelos animales con respecto a los

síntomas no cognitivos sigue siendo una meta aún difícil (revisado por Yamada *et al.*, 2000 y Giménez-Llort *et al.*, 2007).

Según las directrices Janus y Westaway, (2001) un modelo animal ha de tener los siguientes criterios de validez: 1) Progresión de la neuropatología (depósitos β A), 2) déficits cognitivos, 3) replicable entre varios laboratorios, 4) discernir el efectos patogénicos de las formas familiares (FAD) y 5) abarcar más de una línea de transgénicos.

En las últimas dos décadas, se ha empezado a utilizar la manipulación genética de la línea germinal para obtener animales transgénicos con mutaciones determinadas, como medio para reproducir procesos patológicos humanos en animales experimentales y conseguir de esta manera modelos de animales que permitan estudiar las bases, mecanismos, estrategias preventivas y terapéuticas de los fármacos en los seres humanos. Esta tecnología se basa en: 1) Inactividad de genes específicos o mutaciones a variantes patológicas, 2) Introducción de nuevos genes, por ejemplo humanos, 3) Sobreexpresión de genes mediante la inserción de copias adicionales y 4) Control de la expresión genética (Törnell *et al.*, 2002).

Se han desarrollado diversos animales para la EA, que presentan una o más características patológicas de la enfermedad, tales como deposición de β A y la hiperfosforilación de tau. Además, las deficiencias cognitivas también están presentes en muchos modelos donde se han podido estudiar el aprendizaje y la memoria. Algunas de las especies que han sido utilizadas para el estudio de la EA han sido los ratones, ratas, moscas, peces, conejos, perros, cobayas y primates no humanos. La diversidad de modelos animales actuales se puede utilizar para facilitar el descubrimiento de nuevas terapias y proporciona una visión de la etiología de la EA. Los modelos más ampliamente utilizados son los ratones transgénicos (Sabbagh *et al.*, 2012).

La rápida evolución en el estudio del genoma del ratón y de las técnicas de ingeniería genética, han dado lugar a una explosión de linajes en ratones transgénicos o con alteraciones dirigidas del genoma. Las primeras líneas de ratones transgénicos presentaban la mutaciones familiares de APP (Games, D., *et al.*, 1995 y Hsiao *et al.*, 1995), mientras que los modelos posteriores se han basado en las mutaciones de PS1 (Duff *et al.*, 1996), mutaciones de tau (Lewis *et al.*, 2000), o una combinación de 2 o 3 mutaciones (Holcomb *et al.*, 1999; Lewis *et al.*, 2001 y Oddo *et al.*, 2003) como se detalla en la siguiente tabla.

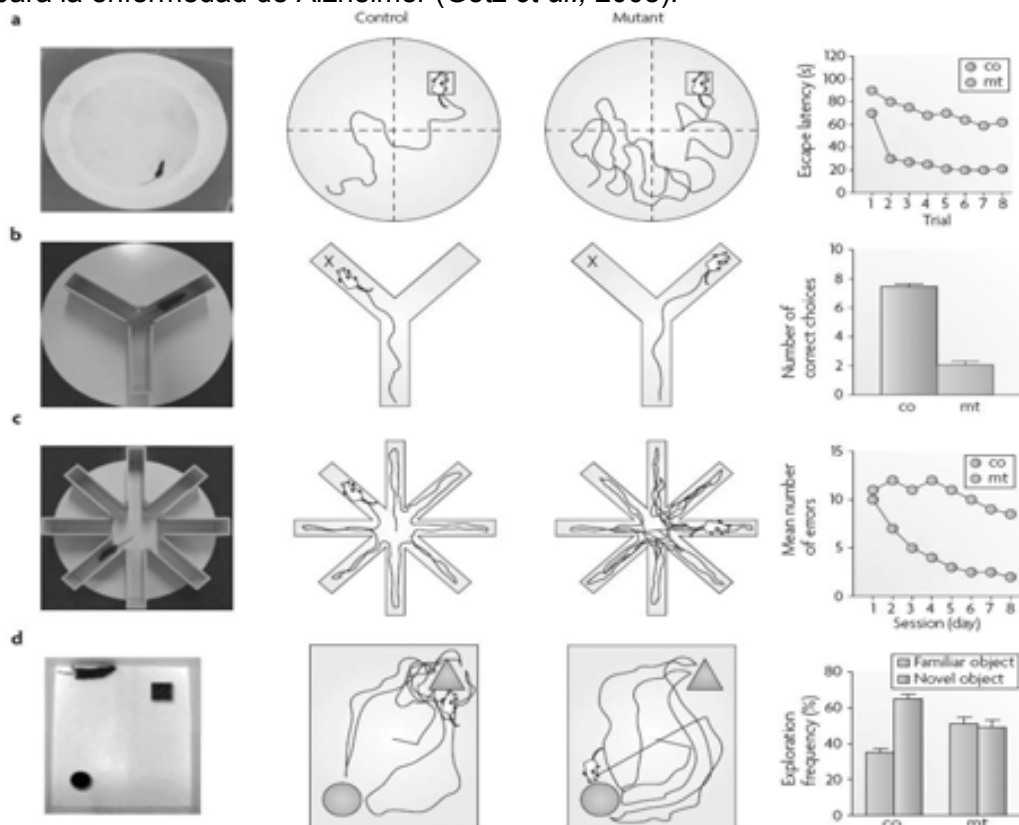
Tabla II. Resumen de los modelos transgénicos más utilizados para la enfermedad de Alzheimer (Sabbagh *et al.*, 2012).

Línea transgénica	Mutación (es) / transgén	Patología primaria (edad de aparición, meses)	Déficit cognitivos (edad de aparición, meses) ^a
PDAPP	APP (Indiana)	A β plaque deposition (6-9)	MWM (4)
Tg2576	APP (Swedish)	A β plaque deposition (9)	MWM (9); CCF (5)
APP23	APP (Swedish)	A β plaque deposition and CAA (6)	MWM (3)
J20	APP (Swedish and Indiana)	A β plaque deposition (6)	MWM (6)
PS1	PS1 (M146L)	None	NA
PSAPP	PS1 (M146L) and APP (Swedish)	A β plaque deposition (3)	MWM (6); CCF (5)
5XFAD	PS1 and APP	A β ₄₂ accumulation and plaque (2)	MWM (6); CCF (6)
JNPL3	Tau (P301L)	Tangles aggregation (4-6)	NA
Tg4510	Tau (P301L inducible)	Tangles and neuronal loss (4-6)	MWM (4)
hTau	Human tau	Tangles and neuronal loss (15)	MWM (12)
TAPP	APP (Swedish) and tau (P301L)	A β deposition and enhanced tau pathology (6)	NA
3xTg-AD	PS1, APP and tau	Soluble A β , plaques and tangles (6)	MWM (6)

β A, proteína beta-amiloide; AD, enfermedad de Alzheimer; CAA, la angiopatía amiloide cerebral, NA, no aplicable. ^a La presencia de déficits cognitivos en cada modelo se limita al laberinto acuático de Morris (MWM) y el condicionamiento contextual del miedo (CCF).

Estudios comportamentales en los modelos transgénicos para la EA (Figura I), han producido resultados muy relevantes en diversas áreas de la investigación neurocientífica de los trastornos mentales. Este es el caso de la línea triple transgénica que exhibe características fenotípicas de la Enfermedad de Alzheimer, creado por el laboratorio del profesor Frank M. LaFerla, de la Universidad de California Irvine. Estos animales no sólo manifiestan las características neuropatológicas distintivas del trastorno en el tejido cerebral, sino que presentan deterioros en el test de memoria y aprendizaje con un curso progresivo en función de la edad.

Figura I. Test conductuales para evaluar la memoria en modelos de animales para la enfermedad de Alzheimer (Götz *et al.*, 2008).



Pruebas utilizadas para comparar los ratones mutantes vs. control. a) El laberinto acuático de Morris para medir la memoria de referencia espacial. b) El laberinto Y para evaluar la memoria de trabajo espacial. c) El laberinto de brazos radiales para medir la memoria de trabajo a corto plazo. d) Prueba de reconocimiento de objetos nuevos, para observar si distingue el objeto nuevo del viejo.

El ratón triple transgénico para la enfermedad de Alzheimer, alberga transgenes humanos PS1/M146V, APP_{swe} y tauP301L (Oddo *et al.*, 2003a). Estos roedores mimetizan de forma singular diversos síntomas de la enfermedad en un patrón temporal y neuroanatómico similar al observado en humanos. El inicio de los síntomas se ha establecido entre los 4 y 6 meses de edad, con déficits electrofisiológico (en LTP y fEPSP) a nivel hipocampal, problemas de aprendizaje y memoria, deficiencias colinérgicas y alteraciones emocionales, a pesar que los cerebros de los animales sólo muestran presencia de inmunoreactividad intraneuronal de β A (Giménez-Llort *et al.*, 2007; Kitazawa, *et al.*, 2005 y Oddo *et al.*, 2003a, b). A partir de los 12 meses de edad el perfil neuropatológico encuentra su paralelismo con las fases avanzadas de la enfermedad en humanos, con los característicos depósitos de β A y los ovillos neurofibrilares de proteína tau (Oddo *et al.*, 2003a, b).

Desde la creación del ratón 3xTg-AD para la enfermedad de Alzheimer se han realizado una variedad de trabajos de investigación que contribuyen al avances en los estudios de la patología de la enfermedad de Alzheimer como es el caso de: testosterona (Rosario *et al.*, 2012), ejercicio físico (Gimenez-Llort *et al.*, 2010 y García-Mesa *et al.*, 2011), cambios en el ciclo circadiano (Gimenez-Llort *et al.*, 2007 y Sterniczuk *et al.*, 2010), estudios con memantina (Martínez-Coria, *et al.*, 2010), mecanismos patológicos de la conducta emocional (España *et al.*, 2010), diferencias de género (Clinton *et al.*, 2007), nicotina (Oddo *et al.*, 2005) entre muchos otros.

Para los estudios con antipsicóticos en modelos animales para la enfermedad de Alzheimer solo existen tres trabajos de investigación aparte del propio (Gimenez-Llort *et al.*, 2009) donde se han centrado en la disminución de las conductas de agresividad y agitación dentro del espectro de los síntomas conductuales y psicológicos de la demencia. En los estudios con ratones transgénicos AAP/london (Moechars *et al.*, 1998) han utilizado la busperidona, agonistas serotoninérgicos y risperidona para reducir los niveles de agresividad

en este modelo animal, en los APP23 (Vloeberghs *et al.*, 2008) identificaron la sensibilidad del antipsicótico atípico risperidona para la reducción de la agresividad y en los ratones ddY (Uchida *et al.*, 2009) se han utilizado los antipsicóticos para el estudio de la agresividad y agitación (Tabla III).

Tabla III. Resumen de los modelos animales (ratones) con estudios antipsicóticos

Estudio con antipsicóticos	Modelo animal (ratones)	Fármacos	Referencias
Esquizofrenia	mpk1	Haloperidol, clozapina, risperidona e inhibidor PDE10A.	Langen, <i>et al.</i> , 2012.
	C57BL/6J ♀	Risperidona.	Cope, <i>et al.</i> , 2009.
	C57BL/6 ♂	Clorpromazina, clozapina, haloperidol, loxapina y risperidona.	Dwyer, <i>et al.</i> , 2003.
Depresión	C57BL/6J ♂	Mirtazapina y risperidona.	Rogoz, Z <i>et al.</i> , 2011.
	C57BL/6J ♂	Mirtazapina, fluoxetina y risperidona.	Rogoz, Z., 2010.
	PACAP -/- ♂	Desipramina, risperidona, haloperidol y ritanserina.	Hashimoto, <i>et al.</i> , 2009.
Ansiedad	NMRI ♂	36 compuestos antipsicóticos típico y atípicos, inhibidores selectivos de la serotonina, benzodiazepina, compuestos D2/5-HT1A.	Bruins, <i>et al.</i> , 2005.
	NIH Swiss ♂	Inhibidores de la serotonina.	Li, X., <i>et al.</i> , 2006.
	ICR ♂	Haloperidol, perospirona y risperidona.	Matsushita, <i>et al.</i> , 2006.
	ICR ♂	Fluvoxamina, milnacipran y risperidona.	Miyamoto, <i>et al.</i> , 2004.
	MF1 ♀	Antagonistas 5-HT.	Njung'e, <i>et al.</i> , 1991.
Enfermedad de Alzheimer	ddY ♂	Quetiapina, risperidona y metanfetamina.	Uchida, <i>et al.</i> , 2009.
	3xTg-AD ♂	Risperidona.	Giménez-Llort <i>et al.</i> , 2009.
	APP23	Risperidona.	Vloeberghs, <i>et al.</i> , 2008.
	APP/London	Busperidona, agonistas serotoninérgicos y Risperidona.	Moechars, <i>et al.</i> , 1998.
Otros	mdr1a/1b ♂	Risperidona y haloperidol.	Kirschbaum, <i>et al.</i> , 2008.
	ICR ♂	Risperidona y naloxonazina.	Schreiber, <i>et al.</i> , 1997.

Alteraciones conductuales que afectan los patrones sociales

Son muchos los factores sociales que se han asociado con la calidad de vida de los individuos, incluyendo el nivel socioeconómico (tanto a nivel individual y/o grupal), el dominio y/o control sobre las circunstancias de la vida, apoyo social de familiares y amigos, la participación social en actividades de grupo, el capital social y la cohesión social (Andrew *et al.*, 2010). Cuando las personas envejecen se vuelven más vulnerables y frágiles a las circunstancias sociales que tienen una repercusión en la salud del individuo (Andrew *et al.*, 2008). Algunos estudios han indicado que la vulnerabilidad social durante el envejecimiento está asociada a la mortalidad y el deterioro cognitivo (Panza *et al.*, 2011 y Andrew *et al.*, 2008).

La enfermedad de Alzheimer tiene un gran impacto en los factores sociales donde se observan ausencia en la interacción social, apatía, conducta depresiva y aislamiento social que repercuten en la rutina diaria. Los individuos se vuelven progresivamente más vulnerables y dependientes de familiares y/o personal sanitario (Chung *et al.*, 2000).

En los trabajos de esta tesis doctoral se evalúo la conducta social en roedores. Por tanto, es importante en esta introducción distinguir los contextos normales y las alteraciones de los patrones sociales.

La conducta social es una característica fundamental de los organismos vivos y se define como una interacción entre los miembros de una misma especie (Sokolowski *et al.*, 2010). Las estructuras sociales normales involucran de forma implícita conductas relacionadas con diversos grados de orden jerárquico o de igualdad, que dependen de factores genéticos (p.ej. cepa de ratón, género, edad, sistemas neuroquímicos o mutaciones genéticas) y ambientales (por ejemplo, condiciones de estabulación, alimentación, temperatura, aislamiento, diadas o composición del grupo social, desarrollo perinatal). Se trata, de

estructuras dinámicas y cambiantes, pero cuyas desviaciones por defecto (p.ej. apatía, anhedonía, aislamiento) o por exceso (p.ej. agresividad, irritabilidad, agresividad sexual) pueden alcanzar el rango patológico y llegan a formar parte de criterios diagnósticos de enfermedades neurológicas y psiquiátricas, además de estar presentes como síntomas de otros tipos de enfermedades más orgánicas (ver Tabla IV).

Cuando se estudia la conducta social se deben tener en cuenta varios conceptos que la definen. Por ejemplo, en cualquier grupo de animales los individuos poseen atributos sociales que influyen en su relación social con otros animales y permiten definir el concepto de sociabilidad como “la tendencia a formar relaciones cooperativas interdependientes que permiten una comunicación recíproca que trasciende la mera actividad sexual” (Keeling *et al.*, 2001). De hecho, el establecimiento en grupo es uno de los hechos más significativos de las especies animales, y es la base de su organización social (Keeling *et al.*, 2001). Cada especie ha desarrollado patrones de conductas y mecanismos fisiológicos de la conducta adaptativa que se encuentran relacionados con su propia organización social y la dinámica de la población (Hedrich *et al.*, 2004).

Tabla IV. Principales estudios de las conductas sociales, modelado de trastornos neurológicos, psiquiátricos y de otras enfermedades

Estudio de las conductas sociales en:	Modelo animal (Ratones)	Referencias
Esquizofrenia	Ratones homocigotos PACAP Ratones ICR Ratones KO calcineurin (CN)	Ishihama, <i>et al.</i> , 2010. Wang, <i>et al.</i> , 2007. Miyakawa, <i>et al.</i> , 2003.
Depresión	Ratones albinos Ratones ddY	Pandey, <i>et al.</i> , 2010. Tsunekawa, <i>et al.</i> , 2008.
Enfermedad de Alzheimer	Ratones APP ^{swe} /PS1 Ratones Tg2576	Filali, <i>et al.</i> , 2009. Deacon, <i>et al.</i> , 2008.
Síndrome Frágil X	Ratones knockout Fmr1 Ratones knockout Fmr1 Ratones knockout GSTM1	Mines, <i>et al.</i> , 2010. Spencer, <i>et al.</i> , 2005. Yochum, <i>et al.</i> , 2010.
Autismo	10 cepas endogámicas: AKR/J, C57BL/6J, C58/J, DBA/2J, FVB/NJ, NOD/LtJ, NZB/BINJ, PL/J, SJL/J, y SWR/J. Ratones uPAR, Pten y En2	Moy, <i>et al.</i> , 2008. Crawley, JN., 2007.
Enfermedad de Huntington	Ratones R6/2.	Wood, <i>et al.</i> , 2010.
Síndrome Rett	Ratones RTT [Mecp2(308/Y)] y 129/SvEv WT. Ratones Swiss CD-1	Moretti, <i>et al.</i> , 2005. Terranova, <i>et al.</i> , 2001.
Cáncer	Ratones C3(1)/SV40 T-antigen	Williams, <i>et al.</i> , 2009.
Isquemia cerebral	Ratones C57/BL6	Karelina, <i>et al.</i> , 2009.
Epilepsia	Ratones EI y ddY Ratones Heterocigotos knockout Htr1a	Turner, <i>et al.</i> , 2007. Zanettini, <i>et al.</i> , 2010.
Trastornos de Ansiedad	Ratones C57BL/6N (B6N) y C57BL/6JOla (B6JOla) Ratones CB1-KO y WT	Siegmund, <i>et al.</i> , 2007. Haller, <i>et al.</i> , 2004.
Agresividad	Ratones C57BL/6J y FVB/NJ Ratones C57BL/6J Ratones albinos CF1	Kovacsics, <i>et al.</i> , 2010. Ho, <i>et al.</i> , 2010. Linck, <i>et al.</i> , 2010.
Farmacología y drogas	Ratones CD-1 Ratones OF1 Ratones CD-1 Ratones DAT -/-	Zou, <i>et al.</i> , 2009. Estelles, <i>et al.</i> , 2006. Venerosi <i>et al.</i> , 2001. Spielewoy, <i>et al.</i> , 2000.
Dopamina	Ratones ICR	Gariépy, <i>et al.</i> , 1998.
Serotonina	Ratones congénitos C57BL/6	Maekawa, <i>et al.</i> , 2010.
Acetilcolina	Ratones muscarínicos M1R-/-	Miyakawa, <i>et al.</i> , 2001.
Glutamato	Ratones mGluR7-/- y mGluR7+/+	Callaerts-Vegh, <i>et al.</i> , 2006.

Es importante tener en cuenta que los resultados en paradigmas conductuales obtenidos en ratas pueden ser distintas a las que se obtienen en ratones (Crawley *et al.*, 1997). A su vez, entre ratones hay también diferencias según sean las cepas estudiadas o las utilizadas para generar el modelo animal, un factor que normalmente es infravalorado cuando se genera un nuevo modelo animal (se usa la cepa según su disponibilidad en lugar de hacerlo en base a su perfil conductual) y en muchos estudios en los que el enfoque psicológico complementa niveles de estudio más neuroquímicos o moleculares (Crawley, *et al.*, 1997).

Se dice que la estructura social de un grupo depende principalmente de la relación dominancia-subordinación, y/o de otros atributos como agresividad, competitividad, individualismo, etcétera (Keeling *et al.*, 2001). La dominancia es una relación aprendida y predecible entre un par de animales (díada), donde un animal del par es sometido por otro. Los rangos, la jerarquía u orden de dominancia, representan la asignación de un valor numérico a un animal, e intentan describir la posición relativa del mismo con respecto a todos los animales de un grupo (Hedrich *et al.*, 2004).

Por el contrario, hay estructuras sociales en las que se observan conductas agonistas; ésta es el resultado de actos adaptativos que surgen para resolver los conflictos entre dos miembros de una misma especie mediante conductas agresivas o amenazas, conductas de sumisión o pasividad y conductas lúdicas que implican contacto físico (Scott, 1966). La conducta agresiva, es un comportamiento que ocasiona daño o destrucción entre animales. En la mayoría de las especies animales, los machos son más agresivos que las hembras. Algunos autores clasifican la agresividad en agresividad competitiva, donde dos individuos de un mismo grupo que compiten por un mismo recurso y la agresividad territorial, va dirigida hacia un animal que ha invadido el territorio de otro (Keeling *et al.*, 2001).

Los déficits en la conducta social son característicos de muchos trastornos mentales, como el autismo, la esquizofrenia, la depresión y la enfermedad de Alzheimer siendo cada vez más numerosos los estudios en modelado animal. Hoy en día la investigación básica de la conducta social está orientada en torno al género, la agresión y las relaciones parentales. El avance en la comprensión de sus bases biológicas, psicológicas, sociales y la inclusión de la conducta social dentro de las baterías de test conductuales puede contribuir a mejorar la eficacia de estrategias preventivas y terapéuticas no sólo en modelos animales para enfermedades neurológicas y psiquiátricas sino también en otras que afectan la esfera de las relaciones sociales del individuo.

Test para el estudio de las conductas sociales

Los estudios conductuales se han ido enriqueciendo con las aportaciones de los estudios etológicos que abordan las conductas de especies específicas y típicas. En los siguientes apartados se conceptualizan los diferentes test de conductas que se utilizan de forma mayoritaria. Existen test específicos para medir la conducta social como el test de interacción social (TIS), el test de tubodominancia (TTD), efecto Dalila (ED), Agregación social durante la fase del sueño (ASS) y para evaluar las disfunciones ejecutiva y conducta social el test de conducta de anidar o construcción del nido (CA).

Test de interacción social (TIS)

La prueba de interacción social fue desarrollada hace 25 años (File, SE., et al., 1978) utilizando como base etológica los rasgos de ansiedad. El TIS se ha utilizado para estudiar los efectos ansiolíticos y ansiogénicos de factores ambientales o de fármacos y compuestos químicos. Diversas investigaciones han demostrado que la prueba por sí misma induce estados de ansiedad más similares a las experiencias de trastorno de ansiedad generalizada (File *et al.*, 2003).

En la validación inicial de esta prueba (File *et al.*, 1978), se demostró que la reducción de la ansiedad dependía del resultado de un ambiente iluminado y/o no familiar. Sin embargo, el hecho que una rata disminuyera la interacción social, resultaba un incremento de otra actividad (actividades competitivas) como quedarse inmóvil, acicalamiento, explorar, realizar levantamientos y defecación (File *et al.*, 2003).

De acuerdo a la validez predictiva del TIS en el estudio de File, SE., *et al.*, (1980; 1978) evaluaron los efectos del fármaco Clordiazepóxido (5 mg/kg) con una administración crónica y encontraron una disminución de la interacción social y sedación similar en los humanos.

Test de tubo-dominancia (TTD)

El test de tubo-dominancia se utiliza como una medida adicional de la conducta social (Moretti *et al.*, 2005), donde se evalúan las conductas de dominancia y subordinado (Crawley, 1999), además se evalúa el tiempo que es retirado uno de los animales de prueba debido que este comportamiento está asociado a los síntomas negativos de la esquizofrenia.

Efecto Dalila o barbering (ED)

El '*barbering*' también llamado efecto Dalila (por similitud con la historia de Sansón y Dalila en la que Dalila redujo el nivel de cuero cabelludo de su compañero), es una conducta social que se traduce en la pérdida de pelaje y bigotes en los roedores de laboratorio. Se trata de una conducta que puede ser autogenerada por los propios animales o realizada por un compañero de jaula, normalmente el más dominante (Kalueff *et al.*, 2006).

El efecto Dalila en los animales, el afeitado de vibrisas y pérdida de cabello varía de un animal a otro, es decir, unos animales presentan pérdida de cabello

sólo en el hocico, mientras que otros habían perdido cabello en otras partes de la cara y/o cuerpo (Sarna *et al.*, 2000). Durante el desarrollo del efecto Dalila uno de los animales se mantiene en posición pasiva boca abajo, mientras otro (Dalila) le afeita. Existe controversia en diversos estudios si el efecto Dalila genera dolor o placer en el animal. Algunos autores consideran que se aprecia como una actitud “dolorosa” debido que el receptor se estremece, sin embargo, en ningún caso hace el intento de escapar (Sarna *et al.*, 2000). Esta pasividad puede ser por dos motivos, tal vez el receptor pasivo permite el efecto Dalila para reprimir la agresión del dominante o que el receptor lo experimente como una actividad agradable. Sin embargo, Van den Broek *et al.* (1993) especula que el efecto Dalila actúa como un liberador de endorfinas, y para ambos animales puede ser un acto placentero.

Agregación social durante la fase de sueño (ASS)

El hecho de dormir en grupo es un comportamiento normal entre los patrones sociales de los roedores, y la disminución de este comportamiento se observa en diversos modelos de alteraciones conductuales dentro del espectro de la psicosis o esquizofrenia (Lijam *et al.*, 1997). En este estudio se utilizó esta prueba debido que la EA presenta síntomas psicóticos, agitación y falta de interés social. Sin embargo, son todavía extremadamente escasos los estudios que muestran cambios en este hábito social.

Conducta de anidar o construcción del nido (CA)

Hay un grupo de conductas sociales vinculadas directamente con las funciones reproductoras, la crianza y maduración ontogénica de las camadas. Se pueden medir a través de los distintos elementos que se producen de forma sucesiva: apareamiento, anidación, cuidado maternal y juegos.

En el caso de la anidación para los pequeños roedores, los nidos son importantes en la conservación del calor, así como en la reproducción y refugio. El comportamiento de anidación se ha mostrado sensible a las lesiones cerebrales, los agentes farmacológicos y mutaciones genéticas (Deacon *et al.*, 2006).

Esta prueba puede ser considerada como un reflejo de planificación de tipo paso a paso, similar a los síntomas de disfunciones ejecutivas en la EA (Collette *et al.*, 1999 y Graham *et al.*, 2004) igual que en los casos humanos. Además, se conoce que la conducta de nido en ratas es sensible a las lesiones de la corteza prefrontal (Filali *et al.*, 2009). Del mismo modo, en esta prueba se puede reflejar la apatía, uno de los síntomas neuropsiquiátricos más comunes entre los individuos con EA, ejemplificada por una falta de interés en el entorno, aislamiento social y pérdida de motivación para mejorar o trabajar (Chung *et al.*, 2000).

Además, las conductas de anidación se han estudiado en diversos modelos animales de ratón como se detalla en la Tabla V.

Tabla V. Principales estudios de la conducta de anidación

Estudios de la conducta de anidación en:	Modelo animal (Ratones)	Metodología aplicada	Referencias
	Ratones PLCb1-/-	Aislamiento/ Material: algodón.	Koh <i>et al.</i> , 2008.
	Ratones Tbx1	Aislamiento/ Material: algodón.	Hiroi, <i>et al.</i> , 2005.
Trastorno de Ansiedad	Ratones Musculus.	Aislamiento/ Material: algodón.	Greene-Schloesser, <i>et al.</i> , 2011.
	Ratones Swiss NIH	Aislamiento/ Material: algodón.	Li, <i>et al.</i> , 2006.
Depresión	Ratones C57BL/6 J	Aislamiento/ Material: algodón.	Tomida, <i>et al.</i> , 2009.
Enfermedad de Alzheimer	Ratones <i>Mapt</i>	Aislamiento/ Material: algodón	Filali, <i>et al.</i> , 2012.
	3xTg-AD	Aislamiento/ Material: algodón.	Filali, <i>et al.</i> , 2011.
	Ratones APP/PS1	Aislamiento/ Material: algodón y papel.	Wesson, <i>et al.</i> , 2011.
	Ratones Tg2576	Aislamiento/ Material: algodón.	Filali, <i>et al.</i> , 2009.
	Ratones APPswe/PS1	Aislamiento/ Material: algodón.	Filali, <i>et al.</i> , 2009.
	Ratones APPswe/PS1	Aislamiento/ Material: algodón.	Deacon, <i>et al.</i> , 2008.
	Ratones Tg2576	Grupo/ Material: algodón.	Deacon, <i>et al.</i> , 2008.
Síndrome de Rett	Ratones Mecp2Flox/Y	Aislamiento/ Material: algodón.	Samaco, <i>et al.</i> , 2008.
	Ratones VDR y WT.	Aislamiento/ Material: papel.	Keisala, <i>et al.</i> , 2007.
Farmacología	Ratones CK-/-/-doble (KO)	Aislamiento/ Material: algodón.	Streijger, <i>et al.</i> , 2005.
	Ratones LAR-ΔP mice.	Aislamiento/ Material: algodón.	Kolkman, <i>et al.</i> , 2004.
	Ratones C57BL/6J	Grupos/Material: 2 Kleenex®; tiras de papel; 1Kleenex® y algodón.	Hess, <i>et al.</i> , 2008.
Enriquecimiento	Ratones ICR	Aislamiento/ Material: papel reciclable; tela; madera; policarbonato.	Kawakami, <i>et al.</i> , 2007.
	Ratones C57BL/6J y DBA/2J	Aislamiento/ Material: algodón.	Deacon, RMJ., 2006.

Conducta social inducida (IS)

El aislamiento social inducido (IS, del inglés *Isolation-induced*) consiste en aislar el animal durante un mes, para generar un incremento de la agresividad que puede medirse con el test del residente-intruso (RIT, del inglés *Resident-intruder test*). En esta prueba, un ratón (intruso) se introduce en la jaula del animal aislado (residente) y se mide la latencia del primer ataque, número de ataques y el tiempo de persecución por parte del residente (Avitsur *et al.*, 2007). Una variante de este test es la Interrupción del estrés social (SDR, del inglés *Social disruption stress*) en el que, usando un procedimiento similar al anterior, se valora la conducta agresiva de un grupo de animales residentes en una misma jaula frente a un único intruso que es sustituido por otro al cabo de los 2 min de ser atacado (Rondinini *et al.*, 1999). En los estudios de ontogenia, la privación maternal o aislamiento temporal de la cría (MD, del inglés *Maternal deprivation*), normalmente 24h, durante el noveno día postnatal se utiliza para modelar trastornos de la esfera emocional y psiquiátrica que permiten hipotetizar sobre las bases ontogénicas de enfermedades como la esquizofrenia (La Barba *et al.*, 1969).

Test para el estudio de la emotividad

Las emociones pueden ser definidas como "estados que evocan un patrón de habilidades cognitivas, reacciones fisiológicas y respuesta conductual ante un evento", que pueden ser desencadenadas por estímulo interno o externo (Passer *et al.*, 2009). Las pruebas de la emotividad en los ratones de laboratorio, implican que una circunstancia dispare una respuesta emocional específica que pueden ser ansiedad, depresión y/o miedo siendo estos estados de ánimo negativo donde está involucrado el tálamo, la amígdala y la corteza prefrontal (LeDoux, 2000). La ansiedad es un estado natural de tensión o temor ante una situación de amenaza y que interfiere con las actividades normales de la vida diaria (Passer *et al.*, 2009). Las pruebas conductuales para evaluar los

trastornos de ansiedad en ratones son: el laberinto elevado en cruz (EPM), caja de luz/oscuridad (DLB), prueba de interacción social (TIS), el campo abierto (OF) y prueba de esquinas (CT) (Pellow *et al.*,1985; Belzung *et al.*, 1994; Rodgers *et al.*, 2002 y Walf *et al.*, 2007).

Dentro de los trastornos del estado de ánimo se encuentra la depresión caracterizada por estado de ánimo depresivo, disminución acusada del interés o de la capacidad para el placer en todas o casi todas las actividades, pérdida importante de peso o aumento de peso, insomnio o hipersomnias, agitación o entecimiento psicomotores, fatiga o pérdida de energía, sentimientos de inutilidad, disminución de la capacidad para pensar o concentrarse y pensamientos recurrentes de muerte (APA, 2002). Las pruebas más comunes para valorar los cambios biológicos y conductuales de la depresión en los animales son el estrés moderado, choque eléctrico, indefensión aprendida y natación forzada (Seligman *et al.*,1975; Willner *et al.*,1992; Crawley *et al.*, 1997; Willner, 2005 y Castagne *et al.*, 2011).

Prueba del campo abierto (OF)

La prueba del campo abierto fue desarrollada por Calvin Hall (1934) donde el propósito principal del autor fue determinar la posible relación entre la conducta emocional (defecación) y la velocidad de la actividad ambulatoria (distancia recorrida por unidad de tiempo). Donde observó que la respuesta de los animales ante un ambiente nuevo e iluminado eran 'emocional o reactivo' (congelación en inglés *freeze*, defecación y orinar) y 'no emocional o no reactivo' (actividad exploratoria) (Hall, 1936). Hoy en día la prueba del campo abierto se ha convertido en el modelo ideal para evaluar la reactividad emocional de los roedores (Ramos, 2008).

Test de enterramiento de mármoles (MBT)

La prueba de enterramiento de mármol en inglés '*marble burying test*' considerado como un modelo de ansiedad fue descrito por Broekkamp *et al.*, (1986) para evaluar los efectos de los fármacos psicotrópicos en la conducta de enterramiento. Donde observó que eran sensibles a los compuestos como las benzodiazepinas (Broekkamp *et al.*, 1986). Hoy en día se utiliza como un modelo útil de la neofobia, la ansiedad y el comportamiento obsesivo-compulsivo. Presenta una validez predictiva para la detección de nuevos antidepresivos, ansiolíticos y antipsicóticos (Njung'e *et al.*, 1991; Bruins *et al.*, 2008 y Kaurav *et al.*, 2012). El Mármol enterrado es un indicador de niveles de ansiedad en un ratón cuando se encuentra con objetos no familiares (Millán *et al.*, 2002).

Test de natación forzada (FST)

Porsolt *et al.*, (1977) describió un nuevo método conductual para inducir un estado de depresión en ratones. La idea surgió de algunos experimentos de aprendizaje que estaba haciendo con las ratas en un laberinto de agua. La mayoría de las ratas encontraban la salida en 10 minutos, pero otras ratas dejaban de luchar y se mantenían flotando pasivamente (Porsolt *et al.*, 1979). El FST fue diseñado como una prueba de cribado primario de los antidepresivos y sigue siendo uno de los mejores modelos para este procedimiento. Se trata de un modelo de bajo costo, rápido y confiable para probar posibles tratamientos antidepresivos con una alta validez predictiva. Tiene una gran sensibilidad con todas las clases de antidepresivos y sus mecanismos de acción (Porsolt, 2000; Petit-Demouliere *et al.*, 2005 y Malatynska *et al.*, 2012).

Test para el estudio del aprendizaje y memoria

Durante el siglo pasado, el aprendizaje humano, animal y los procesos de memoria han sido ampliamente caracterizados, donde se ha observado que el aprendizaje y la memoria están estrechamente relacionados. (Squire, 1992; Tulving, *et al.*, 1998 y Baddeley, 2010). Para evaluar la memoria de trabajo en ratones, existen diversas pruebas tales como el laberinto radial, el laberinto T y el laberinto Y (Gresack, *et al.*, 2003) y para evaluar el aprendizaje y memoria se incluyen: Morris Water Maze (Morris, 1981), evitación pasiva (Mathis, *et al.*, 1994ab), laberinto acuático en T (Paylor, *et al.*, 1993), y/o miedo condicionado (Paylor, *et al.*, 1994).

Laberinto acuático de Morris (MWM)

La prueba del laberinto acuático de Morris fue desarrollada hace 31 años (Morris, 1981) como un dispositivo para investigar el aprendizaje, la adquisición de la memoria espacial y la memoria a largo plazo en ratas de laboratorio (D'Hooge *et al.*, 2001). El MWM es un procedimiento relativamente simple, por lo general consta de seis ensayos y la ventaja principal es la diferenciación entre el espacio (plataforma-oculta) y no espacial (plataforma visible) (Bromley-Brits *et al.*, 2011). Además los animales pueden utilizar cualquiera de las claves espaciales o estrategias no espaciales para orientarse en la búsqueda de la plataforma oculta bajo el nivel del agua (Vorhees *et al.*, 2006).

El MWM juega un papel importante en la validación de modelos de roedores para los trastornos neurocognitivos, como la enfermedad de Alzheimer (Bromley-Brits *et al.*, 2011).

Laberinto en T (TM)

El laberinto en T ha sido ampliamente utilizado para evaluar la memoria de trabajo y la de referencia en los roedores. Se sabe que los roedores pueden utilizar diferentes estrategias para realizar las tareas, a partir de señales espaciales y no espaciales, como las señales extra-laberinto, la configuración de las claves de la habitación y la orientación del laberinto (Douglas, 1966; Aultman *et al.*, 2001 y Papaleo *et al.*, 2011).

Objetivos

Objetivos

Esta tesis doctoral tiene por objetivo ampliar la caracterización conductual del perfil tipo SCPD y las actividades de la vida diaria de los ratones triple-transgénicos 3xTg-AD, modelo animal para la enfermedad de Alzheimer, así como estudiar la respuesta conductual a antipsicóticos atípicos, tomando como ejemplo la risperidona.

En particular, para cada uno de los cuatro estudios que conforman la tesis, los objetivos son:

Estudio 1

Caracterizar la conducta social en ratones machos y hembras 3xTg-AD a los 13-14 meses de edad que se corresponden con fases avanzadas de la enfermedad, utilizando los test de interacción social (TIS), test de tubo de dominancia (TTD), efecto Dalila (ED) y agregación social durante la fase de sueño (ASS) y determinar qué variables conductuales son las más características de disfunción social en los ratones 3xTg-AD en comparación con ratones NTg del mismo género y edad.

Estudio 2

Caracterizar la conducta de anidación en ratones 3xTg-AD, a modo de actividad de la vida diaria espontánea en roedores, estudiando además del genotipo y el género, el efecto de otros factores como la organización social (en estructuras parentales y siguiendo el protocolo estándar de aislamiento social), la fase de la enfermedad (6 y 12 meses de edad o fases iniciales y avanzadas, respectivamente), el tipo de material (papel de celulosa y algodón) y el curso temporal (desde su inicio, las 24, 42 y 72 horas).

Estudio 3

Caracterizar la tolerancia de la glucosa y el perfil conductual cognitivo y no-cognitivo tipo SCPD en ratones machos 3xTg-AD a los 12-13 meses de edad, que se corresponde con fases avanzadas de la enfermedad, y en comparación con ratones NTg del mismo género y edad.

Estudio 4

Con el fin de modelar la vulnerabilidad inducida por la risperidona, que es uno de los antipsicóticos atípicos más utilizados en pacientes con la enfermedad de Alzheimer, estudiar a nivel longitudinal la esperanza de vida y los efectos conductuales de la administración crónica del fármaco, en ratones machos 3xTg-AD y NTg desde los 13 meses de edad.

Estudio 1: Conductas sociales

Materiales y métodos

Métodos: Aspectos generales

En este apartado se describen, de forma general, los aspectos metodológicos comunes en todos los estudios de esta tesis doctoral, para luego concretar en cada uno de los posteriores estudios, los detalles acerca de los sujetos experimentales y diseño experimental.

Las colonias de ratones triple transgénicos 3xTg-AD (PS1/M146V, transgenes APP^{swe} y tauP301L) y de su correspondiente cepa control no transgénica 3xTg-AD-WT (a partir de ahora NTg) fueron establecidas en el estabulario del laboratorio animal de la Unidad de Psicología Médica del Departamento de Psiquiatría y Medicina Legal, Universitat Autònoma de Barcelona a partir de progenitores creados en la Universidad de California Irvine (Oddo *et al.*, 2003). La descripción completa del modelo animal se detalla en la página 34 de la introducción.

Los animales fueron estabulados en grupos de tres a cinco ratones, en jaulas de plástico estándar tipo Macrolon® (35 x 35 x 25cm) con 1 litro de serrín como lecho y acceso a agua y comida *ad libitum*. Las condiciones ambientales fueron las siguientes: ciclo de luz de 12:12 horas luz/oscuridad con encendido de luces a las 08:45 horas, temperatura ambiental constante entre los $21 \pm 2^\circ\text{C}$ y humedad relativa de $55 \pm 5\%$. Las fases experimentales se realizaron en el estabulario y salas contiguas del laboratorio animal. Todos los experimentos fueron realizados de acuerdo con la legislación española de “Protección de animales y uso de experimentación otros fines científicos”, de acuerdo con la Directiva de la UE 08-88 y “Procedimiento de la Comisión de Ética en Experimentación Animal y Humana” con número CEEAH/UAB: 1018, titulado *Uso de Antipsicóticos en la enfermedad de Alzheimer: estudio de ratones triple-transgénicos 3xTg-AD*.

Estudio 1. Caracterización de las conductas sociales de ratones 3xTg-AD y NTg

Para caracterizar la conducta social en ratones 3xTg-AD se eligieron animales de 13 y 14 meses que se corresponden con fases avanzadas de la enfermedad con manifestación neuropatológica amiloidea y de tau (Oddo *et al.*, 2003). El estudio se llevó a cabo con un total de 65 ratones NTg y 3xTg-AD (machos y hembras) [Tabla 1] en los que se valoró: 1) la agregación social durante la fase de sueño, 2) la interacción social, 3) el efecto Dalila o *barbering* y 4) el nivel de dominancia.

Diseño experimental

Tabla 1. Diseño experimental

Protocolos experimentales:	NTg ♂ 13 meses	3xTg-AD ♂ 13 meses	NTg ♀ 14 meses	3xTg-AD ♀ 14 meses
<i>Experimento 1:</i>				
Agregación social			14	14
Test de interacción social	8	10		
Efecto Dalila o <i>Barbering</i>			14+10	14+9
<i>Experimento 2:</i>				
Test del tubo-dominancia	0	0	14+10	14+9

A continuación se detallan los protocolos utilizados:

Experimento 1

Agregación social durante la fase de sueño (ASS)

Este test (Lijam, *et al.*, 1997) consiste en observar durante un período de 3 días, el porcentaje de animales que duermen juntos en un mismo cuadrante de la jaula.

Test de interacción social en un ambiente nuevo (TIS)

El TIS (Venerosi *et al.*, 2001) consiste en introducir dos ratones de igual genotipo y género, que no se conocen (estabulados en distintas jaulas), en una jaula de plástico estándar tipo Macrolon® (35 x 35 x 25cm). El comportamiento social se midió durante 5 minutos mediante observación directa y a través de la evaluación de imágenes grabadas en vídeo. Se midieron conductas sociales: 1) Investigación social: oler la región anogenital, la cabeza o el hocico de la pareja; 2) Inactividad social: acostado o parado en actitud tranquila (con ojos cerrados o abiertos); 3) Cola vibrante: movimiento repetitivo de la cola contra el serrín. El TIS mide también las conductas no-sociales de tipo competitivas, tales como: 1) Exploración: moverse alrededor de la jaula, haciendo levantamientos, olfateando el aire, las paredes o el serrín; 2) Enterramiento o excavación: cavando en el serrín, usando el hocico y/o las dos patas delanteras; 3) Acicalamiento: limpiarse, lamerse, peinarse, o arañarse en cualquier parte del propio cuerpo.

Efecto Dalila o Barbering (ED)

El efecto Dalila en inglés Barbering evalúa el nivel de alopecia debido a la interacción social entre animales que se estudio con la escala de Kalueff (2006): 0) sin efecto Dalila; 1) bigotes eliminados o reducidos; 2) hocico y cara sin pelos; 3) calvas individuales en zonas de la cabeza y el cuerpo; 4) múltiples zonas alopécicas en la cabeza y/o cuerpo; 5) alopecia grave, incluyendo hocico, cabeza y cuerpo. Se verificó, en todos los casos, que alrededor de la zona afectada no habían cicatrices o formación de costras y que el animal se encontraba en buen estado de salud (Garner *et al.*, 2004a). Se registró también la incidencia por jaula y el área corporal afectada en cm² (Garner *et al.*, 2004a; Sarna *et al.*, 2000).

Para corroborar si el efecto Dalila que se presentó sólo en hembras NTg estaba relacionado con conductas de dominancia, a estos animales se les realizó una prueba específica para medir el rango social denominada Test del tubo-dominancia.

Test del tubo-dominancia (TTD)

Esta prueba (Lijam, *et al.*, 1997) consiste en situar en los extremos opuestos de un tubo acrílico traslúcido (4 cm de diámetro y 25.5 cm de largo) dos ratones de igual genotipo y sexo, dejarles avanzar por él hasta que uno de ellos, el "ganador o dominante", obliga al otro "subordinado" a salir del tubo. La prueba tiene un máximo de tiempo de 120 segundos o hasta que uno de los dos ratones es retirado del tubo.

Análisis estadístico

Los resultados se expresan como promedios \pm error estándar de la media (SEM) y porcentajes. El análisis estadístico se realizó con el software SPSS® versión 15.0; <http://www.spss.com>, Chicago, EEUU.

Para evaluar el efecto de los factores 'genotipo', 'género' y su interacción, se utilizó el modelo lineal general multivariante seguidos de un análisis de varianza ANOVA y un post-hoc Duncan test. Las comparaciones para dos muestras independientes entre dos grupos se realizaron con el Student's *t*-test. Las correlaciones entre distintas variables conductuales se evaluaron usando la correlación de Pearson y para las incidencias se utilizó la prueba de Chi-cuadrado. En todas las pruebas, $P < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo.

Resultados

Experimento 1

Agregación social durante la fase de sueño (ASS)

Cuando se evaluó si los animales dormían juntos durante un período de 3 días, se encontró que no había diferencias significativas entre genotipos ni géneros. Todos los ratones dormían acurrucados y/o cerca uno del otro en un cuadrante de la jaula como se detalla en la Tabla 2.

Tabla 2. Agregación social durante la fase de sueño

Protocolo experimental:	Promedio±SEM NTg ♂=10	Promedio±SEM 3xTg-AD ♂=8	Promedio±SEM NTg ♀=14	Promedio±SEM 3xTg-AD ♀=14
AGREGACIÓN SOCIAL DURANTE LA FASE DE SUEÑO				
<i>Conducta de dormir 24-72 h.</i>	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
<i>Número total de ratones que duermen juntos en una misma zona de la jaula</i>	10/10	8/8	14/14	14/14
Student's <i>t</i> -test * <i>P</i> <0.05, ** <i>P</i> <0.01 y *** <i>P</i> <0.01.				

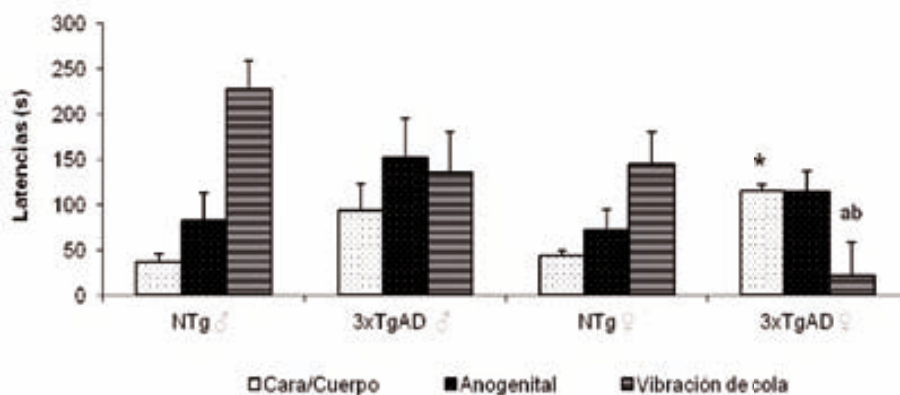
Test de interacción social en un ambiente nuevo (TIS)

En esta prueba se analizaron dos tipos de conductas: las sociales (Figura 1 y Tabla 3) y las no-sociales (Figura 2 y Tabla 4). El modelo lineal general multivariante, seguido de un análisis de varianza ANOVA y la comparación post-hoc Duncan test indicó que los tres componentes conductuales que se distinguen: ‘contacto cara/cuerpo’, ‘contacto anogenital’ y ‘cola vibrante’, presentan latencias de aparición y duración distinta en función del género y genotipo (Tabla 3). En las Figuras 1a, 1b y 1c se ilustran los patrones de conducta social que muestran los animales NTg y 3xTg-AD.

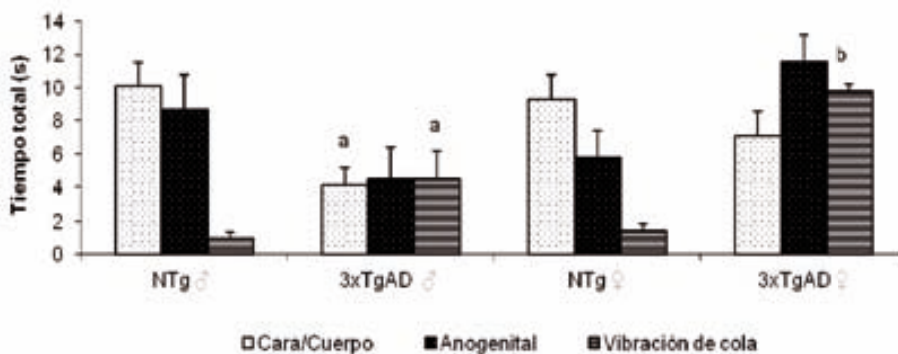
En los ratones NTg la conducta contacto ‘cara/cuerpo’ apareció durante el primer minuto, el ‘contacto anogenital’ se observó a los dos minutos y la ‘cola vibrante’ apareció entre los 2 minutos en hembras y 4 minutos en machos. Este patrón se encontró alterado en los ratones 3xTg-AD tanto a lo que se refiere a la latencia de aparición como la duración (tiempo). En los ratones machos 3xTg-AD se observaron diferencias estadísticas en la aparición de la conducta ‘contacto cara/cuerpo’ y en la conducta ‘cola vibrante’, retrasándose en el tiempo en la primera y adelantándose en la última (Figura 1a). En los ratones hembras se observó el mismo patrón conductual a diferencia de la conducta ‘cola vibrante’ que apareció antes que en los machos (Figura 1a). Estas diferencias se ven también reflejadas en la variable de duración (Figura 1b) y en el número de episodios (Figura 1c).

Conducta social

1a



1b



1c

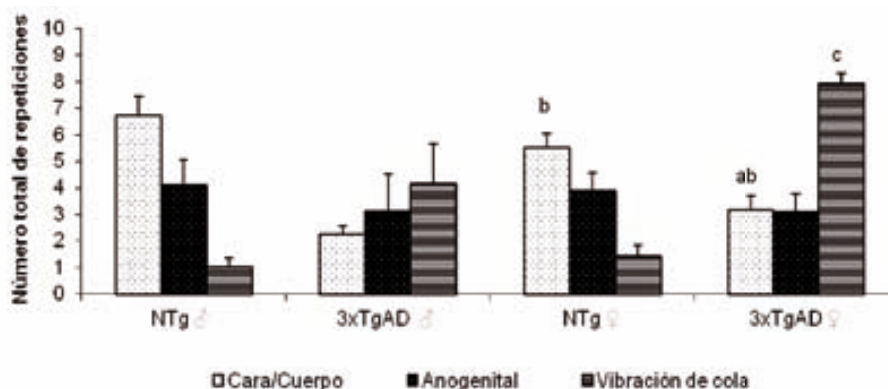


Figura 1. Conducta Social. a, Latencias; b, tiempo total y c, número de episodios. ANOVA 2x2, efecto genotipo, género e interacción (ver tabla 3). Post-hoc Duncan test * $P < 0.05$ vs. todos los otros grupos experimentales; ^a $P < 0.05$ vs. distinto genotipo pero el mismo género; ^b $P < 0.05$ vs. distinto género pero el mismo genotipo y ^c $P < 0.05$ vs. distinto genotipo y distinto género.

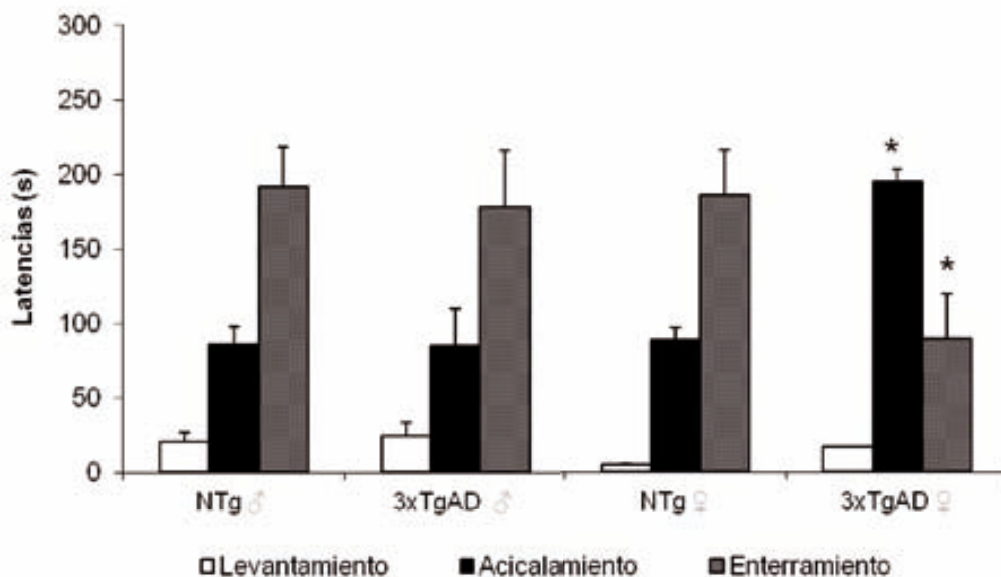
Tabla 3. Test de interacción social

	GENOTIPO	GÉNERO	GENOTIPO X GÉNERO	POST-HOC TUKEY B TEST
	NTg ♂ = 8, NTg ♀ = 14; 3xTg-AD ♂ = 10, 3xTg-AD ♀ = 14			Ver Figura 1
PESOS				
Peso (gr.) (13 meses de edad)			$F_{(1,45)} = 5.497^*$	(*) NTg ♀ ≠ NTg ♂, 3xTg-AD ♀ ♂
CONDUCTA SOCIAL				
Contacto cara/cuerpo				
Latencia de contacto de cara/cuerpo (s)			$F_{(1,45)} = 11.017^{**}$	(*) 3xTg-AD ♀ ≠ 3xTg-AD ♂, NTg ♂ ♀
Tiempo total (s)			$F_{(1,45)} = 5.334^*$	(*) 3xTg-AD ♂ ≠ NTg ♂
Número total de episodios			$F_{(1,45)} = 29.921^{***}$	3xTgAD ♂, (b) NTg ♀ ≠ (a,b) 3xTg-AD ♀, NTg ♂
Contacto anogenital				
Latencia de contacto anogenital(s)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Tiempo total (s)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Número total de episodios	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Cola vibrante				
Latencia de vibración de cola (s)	$F_{(1,45)} = 6.209^*$	$F_{(1,45)} = 10.414^{**}$	$F_{(1,45)} = 12.455^{**}$	(a,b) 3xTg-AD ♀ ≠ 3xTg-AD ♂, NTg ♀
Tiempo total (s)	$F_{(1,45)} = 4.074^*$	$F_{(1,45)} = 8.594^{**}$	$F_{(1,45)} = 37.005^{***}$	(a) 3xTg-AD ♂ ≠ (b) 3xTg-AD ♀, NTg ♂
Número total de episodios	$F_{(1,45)} = 4.707^*$	$F_{(1,45)} = 6.406^*$	$F_{(1,45)} = 33.133^{***}$	(c) 3xTg-AD ♀ ≠ NTg ♂
Tiempo total sin contacto	n.s.	n.s.	n.s.	(c) 3xTg-AD ♀ ≠ NTg ♂
CONDUCTA NO-SOCIAL				
Actividad vertical				
Latencia del primer levantamiento (s)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Número total de levantamiento	n.s.	n.s.	$F_{(1,45)} = 4.628^*$	(b) NTg ♀ ≠ NTg ♂
Actividad horizontal				
Número total de esquinas	$F_{(1,45)} = 12.836^{**}$	$F_{(1,45)} = 11.391^{**}$	n.s.	(b) NTg ♀, (a,c) 3xTg-AD ♂ ♀ ≠ NTg ♂
Conducta acicalamiento				
Latencia de acicalamiento (s)	$F_{(1,45)} = 7.534^{**}$	$F_{(1,45)} = 8.469^{**}$	$F_{(1,45)} = 7.324^{**}$	(*) 3xTg-AD ♀ ≠ 3xTg-AD ♂, NTg ♂ ♀
Número de total de acicalamiento	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Conducta de enterramiento				
Latencia de enterramiento (s)	n.s.	n.s.	n.s.	(*) 3xTg-AD ♀ ≠ 3xTg-AD ♂, NTg ♂ ♀
Número total de enterramiento	$F_{(1,45)} = 5.424^*$	$F_{(1,45)} = 4.690^*$	$F_{(1,45)} = 11.564^{**}$	(*) 3xTg-AD ♀ ≠ 3xTg-AD ♂, NTg ♂ ♀

Modelo lineal general multivariante, ANOVA y Post-hoc Tukey B Test: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ y *** $P < 0.001$.

Conductas no-sociales

2a



2b

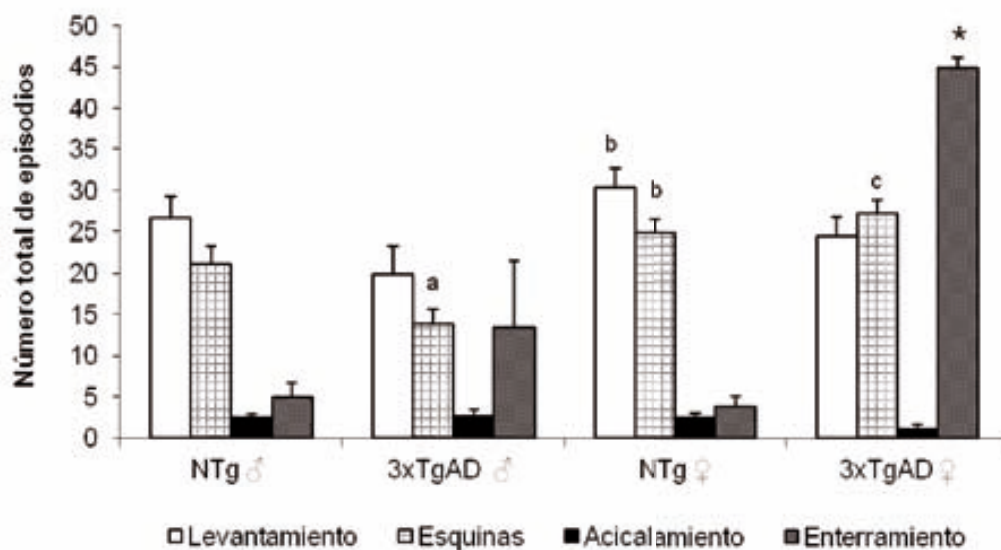


Figura 2. Conductas no-sociales. a, Latencias y b, número total de episodios. ANOVA 2x2, efecto genotipo, género e interacción (ver tabla 3). Post-hoc Duncan test * $P < 0.05$ vs. todos los otros grupos experimentales; ^a $P < 0.05$ vs. distinto genotipo pero el mismo género; ^b $P < 0.05$ vs. distinto género pero el mismo genotipo y ^c $P < 0.05$ vs. distinto genotipo y distinto género.

Las conductas no-sociales se analizaron también con el modelo lineal general multivariante, seguido del análisis de varianza ANOVA y la comparación post-hoc Duncan test, como en el caso anterior. En las Figuras 2a y 2b ilustran el patrón normal de las conductas no-sociales, en las que se evaluaron cuatro aspectos: 'levantamiento', 'esquina', 'acicalamiento' y 'enterramiento'. Estas conductas presentan latencias de aparición y número total de episodios distintas en función del género y genotipo como se detalla en la Tabla 3.

En los ratones NTg la conducta 'levantamiento' apareció durante los primeros 5s en hembras y a los 20s en machos, el 'acicalamiento' se observó al minuto y medio y el 'enterramiento' apareció a los dos minutos y medio en ambos géneros. Este patrón de conductas no-sociales se encontró alterado en los ratones 3xTg-AD tanto a lo que se refiere a la latencia de aparición como el número de episodios.

En los ratones machos 3xTg-AD se observaron diferencias estadísticas en la aparición de las conductas con latencias de 'acicalamiento' y de 'enterramiento' retrasadas en el tiempo. En los ratones hembras 3xTg-AD se observó el mismo patrón conductual, pero la latencia de 'acicalamiento' apareció después de los machos (Figura 2a). Estas diferencias se vieron también reflejadas en la variable de número de episodios (Figura 2b). De forma general las variables significativas más sensibles a los factores fueron las relacionadas con la latencia de 'acicalamiento' y el número total de 'enterramiento' [todas las $F > 3.289$, $P < 0.001$] tal como se detalla en la Tabla 3.

Efecto Dalila o Barbering (ED)

El efecto Dalila estuvo presente exclusivamente en el grupo de hembras NTg. En la Tabla 4 se indican los valores promedio de la 'incidencia del efecto Dalila', la puntuación obtenida usando la 'escala total' y el 'área en cm^2 ': Las tres

variables muestran diferencias significativas respecto al género (machos NTg) y al genotipo (hembras 3xTg-AD) [todas las $t < 2.317$, gl 17, $P < 0.05$].

Tabla 4. Efecto Dalila o Barbering

	Promedio \pm SEM NTg σ =10	Promedio \pm SEM 3xTg-AD σ =8	Promedio \pm SEM NTg σ =14	Promedio \pm SEM 3xTg-AD σ =14
EFFECTO DALILA O BARBERING				
Incidencia de Dalila	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.40 \pm 0.16	0.00 \pm 0.00* ^c
Escala total	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.80 \pm 0.35	0.00 \pm 0.00* ^b
Área Cm ²	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.25 \pm 0.12	0.00 \pm 0.00* ^a
Student's <i>t</i> -test; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ y *** $P < 0.001$. Chi-cuadrado ^a $P < 0.001$, ^b $P < 0.01$ y ^c $P < 0.05$.				

Experimento 2

Test del tubo-dominancia (TTD)

Con la finalidad de averiguar si el efecto Dalila encontrado en hembras NTg era debido a diferencias en el nivel de dominancia por genotipo se realizó el TTD. En ambos grupos los animales mostraron la existencia de jerarquías y los valores de las variables estudiadas fueron similares tal como se ilustra en la Figura 2 aunque la comparación para muestras independientes mostró diferencias significativas entre el grupo 3xTg-AD y NTg en el tiempo de retirada [todas las $t > -3.730$, gl 17, $P < 0.01$]. La correlación de Pearson entre el Test de

Tubo-dominancia (TTD) y el efecto Dalila (ED) aplicada al grupo de ratones hembras NTg tampoco indicó relación entre las variables de los dos tests.

Test del tubo-dominancia

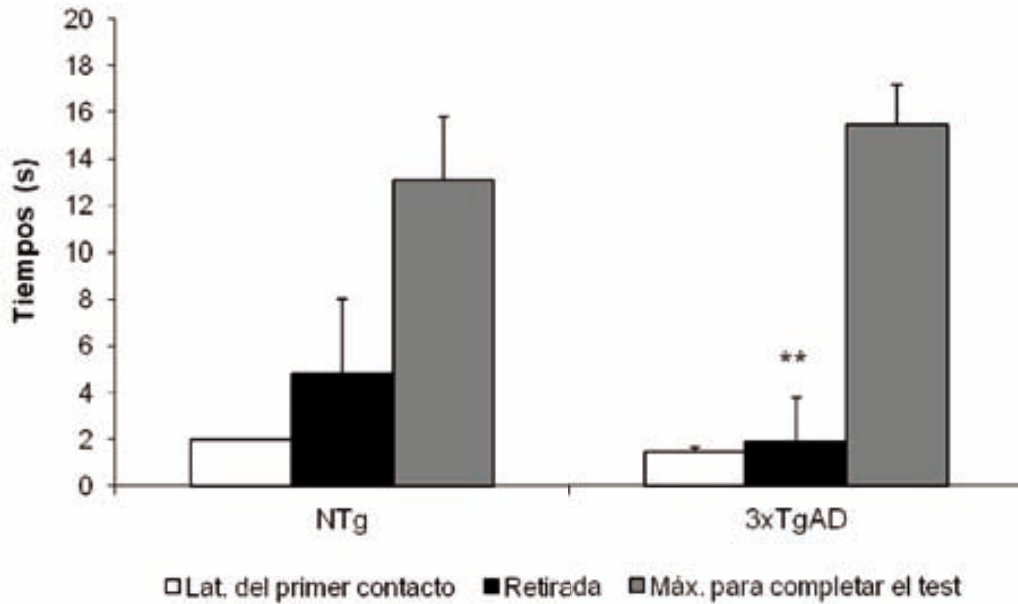


Figura 3. Test del tubo-dominancia. Variables: latencia del primer contacto, retirada y tiempo máximo para completar el test. Student's *t*-test; ** $P < 0.01$.

Discusión

La conducta social es una característica fundamental de los organismos sociales, modulada por factores endógenos, genéticos y ambientales. Los déficits en la interacción social son definidos por endofenotipos, y se encuentran presentes en diversos trastornos psiquiátricos (Crawley, 2004). Los déficits en la conducta social son característicos de muchos trastornos mentales, como el autismo, la esquizofrenia, la depresión y la EA (Riedel *et al.*, 2009). A pesar de que hay diversas pruebas que indican que la interacción social es también un fenotipo o endofenotipo de la EA, los mecanismos subyacentes y las causas siguen siendo complejas (Rockwood *et al.*, 2002).

En este primer estudio de la tesis doctoral se caracterizó, por primera vez en los ratones 3xTg-AD y en comparación con sus controles NTg, el patrón de interacción social mediante la valoración de diversas conductas sociales como el ‘contacto cara-cuerpo’, el ‘contacto ano-genital’, la presencia de ‘cola vibrante’ así como las conductas no-sociales de tipo competitivas ‘exploración’, ‘enterramiento’ y ‘acicalamiento’. Con este experimento se esperaba encontrar que los ratones 3xTg-AD presentaran alteraciones en las conductas sociales, ya que estos animales son vulnerables a la aparición de conductas tipo ansiosas (Giménez-Llort *et al.*, 2007).

Los resultados obtenidos indicaron que el patrón social de los ratones 3xTg-AD está alterado y los animales presentan una disminución significativa en los ‘contactos cara/cuerpo’ y un incremento de la conducta de ‘cola vibrante’ con respecto a los animales NTg. La disfunción conductual también se observó en las conductas no-sociales de tipo competitivas. Así, los ratones 3xTg-AD difirieron significativamente respecto a sus controles en las conductas de ‘enterramiento’ y ‘acicalamiento’, dos variables directamente relacionadas con la emotividad y la ansiedad (revisado por Fernández-Teruel *et al.*, 2005). En concreto, el ‘enterramiento’ disminuye y el ‘acicalamiento’ se retrasa. Estas diferencias conductuales en los ratones 3xTg-AD se podrían asociar a los síntomas de ansiedad, reducción de la actividad locomotora y una pérdida de interés, relacionados con la disminución de la conducta social y cognitiva en los pacientes con la EA (Dyck *et al.*, 2009; Cummings, 2000).

Además en este estudio se encontró una diferencia significativa entre el grupo de machos y hembras 3xTg-AD, donde se observó que ambos géneros expresan la ansiedad de forma diferente, ya que la ‘cola vibrante’ fue una conducta distintiva de las hembras 3xTg-AD. Otros estudios con ratones 3xTg-AD han observado diferencias de género en conducta de ansiedad (Pietro Paolo *et al.*, 2008, Giménez-Llort *et al.*, 2008, 2011, García-Mesa *et al.*, 2011). Además, en ratones 3xTg-AD machos de 15 meses de edad se ha demostrado

que su mayor incidencia de conducta ansiosa trasciende hasta el punto de asociarse a un deterioro neuroinmunoendocrino (aumento del peso del bazo y reducción del timo) (Giménez-Llort, *et al.*, 2010).

Estas diferencias conductuales en la conducta social de los ratones 3xTg-AD pueden estar asociadas no solo al perfil ansioso característico de estos animales (Giménez-Llort *et al.*, 2007) si no también influenciadas por problemas apatía y/o agitación, posibles déficits en la memoria social, todos ellos considerados a nivel clínico como primeras manifestaciones sintomáticas de la EA (Norton *et al.*, 2012; Filali *et al.*, 2011 y Andrew *et al.*, 2008). De hecho, estudios con otros modelos animales como los ratones APP^{swe}/PS1 también han demostrado deterioro en la interacción social asociados a déficits en la memoria social (Filali *et al.*, 2011 y Huang *et al.*, 2011). Por otra parte se ha observado que los ratones 3xTg-AD son más sensibles que sus controles NTg a condiciones sociales tales como el aislamiento. Recientemente, estudios de aislamiento social en ratones 3xTg-AD han observado que ambos géneros reducen la actividad locomotora en el campo abierto y aumentan las respuestas de sobresalto acústico (Pietropaolo *et al.*, 2009) en comparación con ratones NTg de su mismo género. También en ratones APP/PS1 se ha observado que el aislamiento social aumenta los niveles de MnSOD en las subregiones CA1-CA3 del hipocampo, que acrecenta su deterioro cognitivo (Huang, *et al.*, 2011). Estos resultados ponen en evidencia la importancia de evaluar las conductas sociales también experimentalmente, ya que los factores sociales son considerados no solo moduladores de la salud mental y física de las personas sino también factores de riesgo en la aparición de síntomas de la demencia (Andrew y Rockwood, 2010).

En este estudio de caracterización de conductas sociales en los 3xTg-AD se consideró también la agregación social durante la fase de sueño, que en modelos animales para trastornos especialmente del espectro psicótico está alterada. Por ejemplo, en el modelo de ratón para la Drosofilia (Dvl1) los

animales tienden a dormir dispersos en la jaula, síntoma que ha sido asociado a la esquizofrenia (Lijam, *et al.* 1997). En nuestro estudio, los ratones 3xTg-AD de 13 y 14 meses de edad el patrón conductual de agregación social durante la fase del sueño era igual de normal que en los animales NTg.

Otra de las manifestaciones de la conducta social abordadas en este estudio de caracterización fue la conducta de '*barbering*', también llamada 'Efecto Dalila'. Se trata de una conducta social que se traduce en la pérdida de pelaje y bigotes en los roedores de laboratorio. Durante el desarrollo del efecto Dalila uno de los animales se mantiene en posición pasiva boca abajo, mientras que el otro ratón (Dalila) le afeita (Sarna *et al.*, 2000; Kalueff *et al.*, 2006). Existen diversas hipótesis sobre el fenómeno del '*barbering*' en los roedores como por ejemplo, factores genéticos, ambientales, jerarquías sociales, estrés y anormalidades neurológicas similares a algunos trastornos del espectro obsesivo-compulsivo en los seres humanos (Hart *et al.*, 2009). En nuestro estudio, el efecto Dalila estuvo presente exclusivamente en el grupo de ratones NTg hembras. Esto podría ser debido a que los ratones 3xTg-AD de ambos géneros y los ratones NTg machos interactúan de forma diferente con sus compañeros de jaula a la manera en la que lo hacen las hembras NTg. Para verificar si esta conducta en la hembras reflejaba su dominancia social, el grupo de hembras NTg fue evaluado en el test de tubo-dominancia, pero los resultados indicaron que en nuestro caso las variables no estaban relacionadas.

La conducta social es uno de los síntomas que acompaña la enfermedad neurodegenerativa. Estos cambios conductuales que acabamos de describir en los ratones 3xTg-AD en edades avanzadas se añaden a la existencia de un declive cognitivo y los cambios conductuales que semejan los "síntomas psicológicos y conductuales de la demencia (SCPD)" (Giménez-Llort, *et al.*, 2007). En interesante señalar como los déficits de las conductas sociales podrían depender del género que es de por si un factor importante en diferentes

test estándares de ansiedad, aprendizaje y memoria (Clinton *et al.*, 2007; García-Mesa, *et al.*, 2011).

Este trabajo caracteriza, por primera vez, la conducta social en ratones 3xTg-AD en fases avanzadas de la enfermedad, en ambos géneros y proporciona variables clave que les diferencian de los ratones NTg. También pone de manifiesto la importancia de considerar las diferencias de género más cuando en los humanos el género femenino tiene un mayor riesgo de desarrollar la enfermedad (Azad, *et al.*, 2007).

Conclusiones

Las conclusiones del Estudio 1 para la *Caracterización de las conductas sociales en animales 3xTg-AD y NTg*, en ambos géneros, a los 13-14 meses de edad, fueron las siguientes:

1. La prueba de *interacción social* indicó la existencia de disfunción social en los ratones 3xTg-AD. Las principales diferencias, debidas al genotipo, al género y su interacción, fueron halladas en la conducta de ‘cola vibrante’ con cambios significativos en las variables de ‘latencia’, ‘duración’ y ‘número de episodios’ siendo la conducta distintiva de las hembras 3xTg-AD. El ‘contacto cara-cuerpo’ mostró interacción de genotipo con género. Entre las conductas no-sociales, la ‘actividad horizontal’, la ‘latencia del acicalamiento’ y el ‘número de episodios de enterramiento’ fueron las variables que presentaron efectos genotipo y género. Éstas dos últimas presentaron además efectos de la interacción genotipo y género.
2. En la *agregación social* durante la fase de sueño, no se observaron diferencias significativas entre los ratones 3xTg-AD y NTg de ambos géneros.
3. El *efecto Dalila* solo estuvo presente en el grupo de hembras NTg y no se encontró asociado a la dominancia evaluada con el test tubo-dominancia.

Estudio 2: Conducta de anidación

Estudio 2. Caracterización de la conducta de anidación en ratones 3xTg-AD

Materiales y Métodos

Sujetos experimentales

La conducta de anidación en ratones 3xTg-AD se estudió en dos experimentos con distintas condiciones sociales: estructura familiar (parejas de 2 ratones) y aislados. Se utilizó un total de 70 ratones machos y hembras NTg y 3xTg-AD aislados u organizados en 45 estructuras familiares según detalla la Tabla 5.

Tabla 5. Diseño experimental

Construcción del nido	6 meses de edad	12 meses de edad
<i>Experimento 1</i>		
NTg	19 (Familia ♂♀)	X
3xTg-AD	26 (Familia ♂♀)	X
<hr/>		
<i>Experimento 2</i>		
NTg	9♂ (Aislados) 7♀ (Aislados)	9♂ (Aislados) 10♀ (Aislados)
3xTg-AD	7♂ (Aislados) 7♀ (Aislados)	10♂ (Aislados) 11♀ (Aislados)

Diseño experimental

El estudio se realizó en base a dos experimentos: Experimento 1. Conducta de anidación o construcción del nido en estructuras parentales y Experimento 2. Conducta de anidación o construcción del nido en aislamiento social.

El primer experimento consistió en estudiar las estructuras parentales a través del siguiente diseño factorial 2x2x3: efecto del genotipo (NTg y/o 3xTg-AD), efecto del material de construcción del nido (papel de celulosa y/o algodón) y el curso temporal de la construcción del nido (24, 48 y/o 72 horas) de acuerdo a la escala de Deacon (2006).

Escala de Deacon

Dos horas después del inicio de la fase de luz, se introdujeron 7 trozos de papel de celulosa verde (70 x 20 mm) en las jaulas con serrín limpio. La calidad de los nidos se evaluó 24, 48 y 72 h después, de acuerdo con la escala de 5 puntos de Deacon (2006):

- 1) Nido, notablemente no tocado (> 90% intacto).
- 2) Nido, parcialmente roto (50-90% restante, intacto).
- 3) (<50%) del material destrozado, pero sin nido de identificación y menos del (<90%) del nido permanece intacto, distribuido dentro de un cuarto del área del suelo de la jaula. (Nota: El material a veces puede estar en un área de anidación en sentido amplio, pero la definición fundamental es que el 50-90% se ha desmenuzado).
- 4) Es un nido identificable, pero el (> 90%) del nido es plano, con muros más altos que la altura del cuerpo del ratón y el material del nido se encuentra dentro de un cuarto de la superficie del suelo de la jaula.
- 5) Un nido (casi) perfecto:> 90% del nido es un cráter, con muros más altos que la altura del cuerpo del ratón, es decir, un 50% de su circunferencia.

La construcción del nido con papel de celulosa verde fue retirada una semana más tarde. En la misma jaula se introdujeron dos trozos de algodón (50 x 50 x 3 mm, Cotofarma, SL, Badalona, España). Se evaluó con el mismo protocolo experimental utilizado con el papel de celulosa.

En el segundo experimento consistió en estudiar el efecto de diversos factores sobre la conducta de anidación en un contexto de aislamiento social, a través del siguiente diseño factorial 2x2x2x2x3: efecto del genotipo (NTg y/o 3xTg-AD), efecto del género (masculino y/o femenino), efecto de la edad o etapa de la enfermedad (inicial 6 meses de edad y/o avanzada 12 meses de edad), el efecto del material del nido (papel de celulosa y/o algodón) y el curso temporal de la construcción de nido (24, 48 y/o 72 horas) de acuerdo a la escala de Deacon (2006). Todos los animales fueron aislados una semana antes de la evaluación de la conducta de anidación. Datos preliminares sugirieron una falta de diferencias genotípicas en la construcción del nido que cuando se utiliza el material de algodón. Por lo tanto, con el fin de verificar la ausencia de diferencias, se evaluó la latencia de la construcción del nido con algodón midiéndose en segundos.

Una vez finalizada la conducta los animales fueron agrupados como estaban antes del inicio del experimento.

Análisis estadístico

Los resultados se expresan como promedios \pm error estándar de la media (SEM) y porcentajes. En los dos experimentos se realizó el análisis estadístico con el software SPSS® versión 15.0; <http://www.spss.com>, Chicago, EEUU.

Para medir el curso temporal de las variables se utilizó el análisis de varianza con medidas repetidas (RMA, *repeated measures* ANOVA), seguido de un análisis de varianza ANOVA y un post-hoc Duncan test para analizar las diferencias entre los grupos. Además, se empleó una prueba *t*-test para datos pareados donde se comparan los resultados obtenidos de un mismo animal en dos ensayos diferentes. En todas las pruebas, $P < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo.

Resultados

1. Diseño y evaluación de la conducta de anidación.

En estos experimentos se evaluó la capacidad de construcción de nido con dos tipos de materiales distintos: 'papel de celulosa' y 'algodón' y el aspecto etiológico: estructuras parentales y aislamiento clásico.

1.1. Experimento 1. Conducta de anidación o construcción del nido en estructuras parentales.

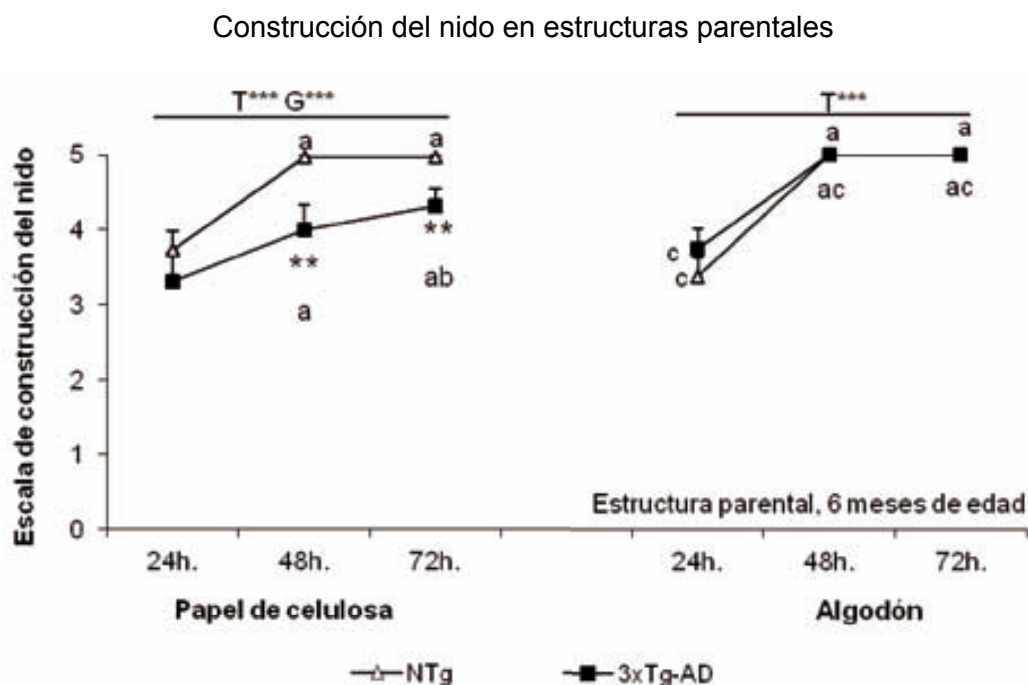


Figura 4. Construcción del nido en estructura parental: NTg y 3xTg-AD. Escala para valorar la construcción del nido 1-5 (Deacon, 2006) con dos tipos de materiales: papel de celulosa y algodón. Student's *t*-test *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$ y * $P < 0.05$ vs. ratones NTg. ANOVA 2x2x3, efecto tiempo (T) y genotipo (G) *** $P < 0.001$. *t*-tests para datos pareados: ^a $P < 0.05$ 24h vs. 48 o 72h; ^b $P < 0.05$ 48h vs. 72h y ^c $P < 0.05$ algodón vs. papel de celulosa.

Como se ilustra en la Figura 4, la construcción del nido en los ratones NTg agrupados en estructuras parentales mostró un curso temporal independiente

del material del nido. Así, el análisis de varianza con medidas repetidas indicó un efecto en el 'tiempo/horas' tanto al analizar material de 'papel de celulosa' [$F_{(2,50)} = 23.105, P < 0.001$] como con el algodón [$F_{(2,50)} = 46.915, P < 0.001$]. Durante las primeras 24 horas todos los ratones NTg tenían el material desmenuzado distribuido dentro de un cuarto del área del suelo de la jaula pero no eran nidos identificables, se corresponde a la escala de Deacon con el nivel 3. Sin embargo, la puntuación media de la calidad de los nidos a las 24 horas indicó que los nidos construidos con 'papel de celulosa' eran más precisos que los realizados con material de 'algodón' y posteriormente, la calidad de todos los nidos fue igual [t para datos pareado, $t_{(25)} = 2.214, P < 0.05$ sólo en 24 horas].

La puntuación máxima con el material de 'papel de celulosa' o 'algodón', se logró a las 48 horas y se mantuvo hasta 72 horas mostrando un patrón temporal bifásico [todas las t para datos pareados $t_{(25)} < -4,807, P < 0.001$, excepto a las 24h]. Además, se observó una incidencia de nidos perfectos con una puntuación máxima de (5 puntos) para el 'papel de celulosa' de [96,15%] y para el 'algodón' [100%].

En los ratones NTg, el análisis factorial indicó efecto del curso temporal con el material 'papel de celulosa' [$F_{(2,86)} = 35.751, P < 0.001$ y con el algodón [$F_{(2,86)} = 63.252, P < 0.001$], efecto genotipo cuando se utilizó el material de 'papel de celulosa' [$F_{(1,43)} = 11.202, P < 0.001$] y no mostró efecto de interacción 'tiempo x genotipo' tanto para 'papel de celulosa' [$F_{(2,86)} = 1.847, n.s.$] como el 'algodón' [$F_{(2,86)} = 0.947, n.s.$].

En los ratones 3xTg-AD, el modelo general multivariante mostró efecto en el curso temporal en el material de 'papel de celulosa' [$F_{(2,36)} = 17.749, P < 0.001$] y algodón [$F_{(2,36)} = 21.246, P < 0.001$] No obstante, el patrón temporal fue progresivo o bifásico, dependiendo del material proporcionado.

Asimismo, se observó en los ratones 3xTg-AD que la calidad del nido a las 24 horas con 'papel de celulosa' fue similar a los realizados por los ratones NTg agrupados en estructuras parentales [*t* de *Student*, $t_{(43)} = 0,944$, *n.s.*]. Realizando una prueba *t* para datos pareados indicó que el avance en la calidad de los nidos a las 48 y 72 horas no fue bifásico en los 3xTg-AD como en los ratones NTg, pero aumentó progresivamente con las horas a las '24h vs. 48h, y 24h vs. 72h' y a las '48h vs. 72h' [todas las $t_{(18)} > -2,882$, $P < 0.01$] y la puntuación máxima de 5 se logró a las 72 horas en el 'papel de celulosa' con una incidencia del [63,16%].

Sin embargo, cuando se cambio el material de 'papel de celulosa' por el 'algodón', los ratones 3xTg-AD agrupados en estructuras parentales fueron capaces de construir nidos exactamente iguales y siguiendo el mismo patrón temporal bifásico de los ratones NTg [todas las $t_{(43)} < -0,973$, *n.s.*]. Además se observó que la puntuación máxima se alcanzó a las 48 horas con una incidencia del [100%] en ambos grupos experimentales. Indicando que la incidencia de nidos perfectos fue significativamente mayor con el material de 'algodón' con respecto al 'papel de celulosa' [prueba exacta de Fisher, $P < 0.01$].

Además, realizando una prueba *t* para datos pareados, indicó que la calidad del nido construido por los ratones 3xTg-AD con el material de 'algodón' era mayor que cuando utilizaban el material de 'papel de celulosa' para cada intervalo de tiempo [todas las $t_{(18)} < -2,191$, $P < 0.05$].

Tabla 6. Conducta de anidación en estructuras parentales.

	Patrón temporal	Tiempo: máxima puntuación	Nidos perfectos
<i>Construcción del nido con 'papel de celulosa'</i>			
NTg, familia 6 meses de edad.	Bifásico	48h	No
3xTg-AD, familia 6 meses de edad.	Progresivo	72h	No
<i>Construcción del nido con 'algodón'</i>			
NTg, familia 6 meses de edad.	Bifásico	48h	Si
3xTg-AD, familia 6 meses de edad.	Bifásico	48h	Si

Por lo tanto, tal como se resume en la Tabla 6, el 'papel de celulosa' indicó diferencias de genotipo, en el curso temporal y en la puntuación máxima. Sin embargo, los nidos perfectos fueron construidos sólo con el material de 'algodón' con una incidencia del 100% en ambos genotipos.

1.2. Experimento 2. Conducta de anidación o construcción del nido en aislamiento social.

Con el fin de estudiar el efecto genotipo, género, edad, en la conducta de anidación en aislamiento social que es el protocolo más utilizado en la literatura, se utilizaron ratones NTg y 3xTg-AD de ambos géneros y en diferentes etapas de la enfermedad. Estos animales fueron aislados de acuerdo a los protocolos estándar y se estudió en tres intervalos de tiempo (24, 48 y 72 horas) teniendo en cuenta los dos tipos de materiales 'papel de celulosa' y algodón' para la construcción del nido. Los resultados se ilustran en la Figura 5.

Construcción del nido en aislamiento social

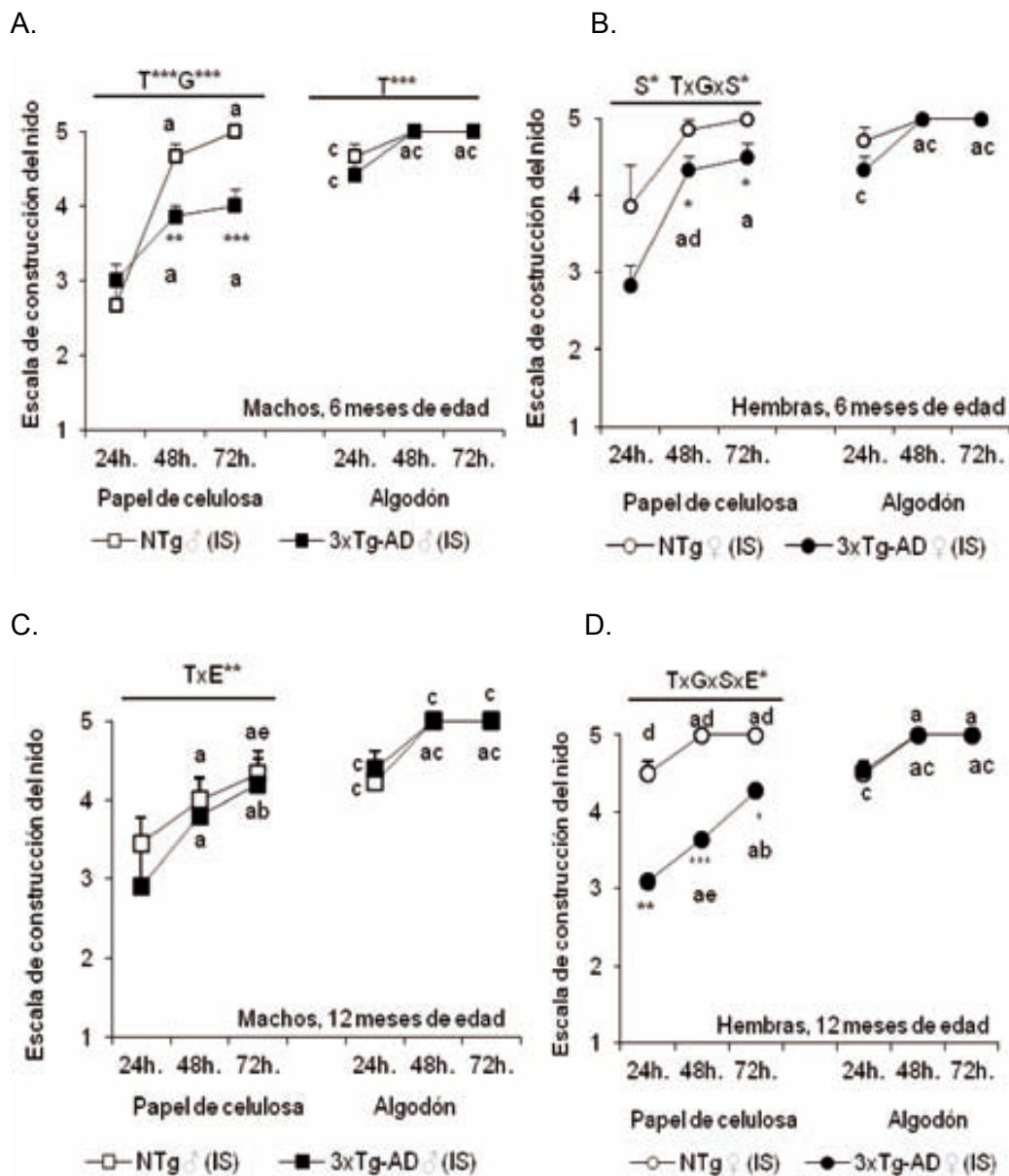


Figura 5. Construcción del nido en aislamiento social: NTg y 3xTg-AD. Escala para valorar la construcción del nido 1-5 (Deacon, 2006) con dos tipos de materiales: papel de celulosa y una semana después con algodón. A. Ratones machos de 6 meses de edad. B. Ratones hembras de 6 meses de edad. C. Ratones machos de 12 meses de edad. D. Ratones hembras de 12 meses de edad. Student's *t*-test *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$ y * $P < 0.05$ vs. ratones NTg. ANOVA 2x2x2x2x3, efecto tiempo (T), genotipo (G), género (S) y edad (E) *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$ y * $P < 0.05$. *t*-tests para datos pareados: ^a $P < 0.05$ 24h vs. 48h o 72h; ^b $P < 0.05$ 48h vs. 72h; ^c $P < 0.05$ algodón vs. papel de celulosa. Student's *t*-test: ^d $P < 0.05$ género (igual edad y genotipo) y ^e $P < 0.05$ edad 6m vs. 12m (igual género y genotipo).

El análisis factorial de la construcción del nido con 'papel de celulosa' indicó efecto del genotipo [$F_{(1,62)} = 17.011, P < 0.001$] y género [$F_{(1,62)} = 4.987, P < 0.05$] pero no mostró diferencias entre la edad y el efecto de interacción [$F_{(1,62)} = 4.667, P < 0.05$].

Además, el curso temporal indicó efecto de genotipo [todas las $F_{(2,124)} = 83.183, P < 0.001$] y mostró efectos de interacción con la edad [$F_{(2,124)} = 6,409, P < 0.01$], el genotipo x género [$F_{(2,124)} = 3,602, P < 0.05$] y genotipo x género x edad [$F_{(2,124)} = 3,583, P < 0.05$].

Las diferencias de genotipo observadas en la conducta de anidación en los ratones NTg y 3xTg-AD agrupados en estructura parental a la edad de 6 meses (experimento 1) también se han reproducido en los animales aislados y para cada uno de los géneros. Los ratones machos fueron los que reprodujeron más de cerca los efectos del genotipo observados en los animales agrupados en estructuras parentales [todas las $t < 6.874, P < 0.001$], mientras que el rendimiento de las hembras 3xTg-AD fue inferior que el de sus pares machos o los ratones 3xTg-AD agrupados en estructuras parentales [todas las $t < 2.828, P < 0.05$].

Sin embargo, con el envejecimiento, se mantienen las diferencias genotípicas en las hembras 3xTg-AD aisladas [todas las t de *Student's*, $< 6.381, P < 0.001$], mientras que se pierde en los machos de 12 meses de edad.

Tabla 7. Caracterización de la conducta de anidación en aislamiento social

	Patrón temporal	Tiempo: máxima puntuación	Nidos perfectos
Construcción del nido con ‘papel de celulosa’			
NTg, ♂ 6 meses de edad	Bifásico	72h	SI
NTg, ♀ 6 meses de edad	Bifásico	72h	SI
NTg, ♂ 12 meses de edad	Bifásico	72h	No
NTg, ♀ 12 meses de edad	Bifásico	48h	Si
3xTg-AD, ♂ 6 meses de edad	Bifásico	72h	No
3xTg-AD, ♀ 6 meses de edad	Bifásico	72h	No
3xTg-AD, ♂ 12 meses de edad	Progresivo	72h	No
3xTg-AD, ♀ 12 meses de edad	Progresivo	72h	No
Construcción del nido con ‘algodón’			
NTg, ♂ 6 meses de edad	Bifásico	48h	Si
NTg, ♀ 6 meses de edad	Bifásico	48h	Si
NTg, ♂ 12 meses de edad	Bifásico	48h	Si
NTg, ♀ 12 meses de edad	Bifásico	48h	Si
3xTg-AD, ♂ 6 meses de edad	Bifásico	48h	Si
3xTg-AD, ♀ 6 meses de edad	Bifásico	48h	Si
3xTg-AD, ♂ 12 meses de edad	Bifásico	48h	Si
3xTg-AD, ♀ 12 meses de edad	Bifásico	48h	Si

La mejora de la calidad de los nidos con ‘papel de celulosa’ durante los días posteriores fue bifásica en los ratones NTg de 6 meses de edad para cada uno de los géneros, pero aumentó progresivamente con las horas y la puntuación máxima de 5 se logró a las 72 horas en ‘papel de celulosa’ con una incidencia del [100%] tanto para el grupo de machos como para el de hembras. En los ratones 3xTg-AD la puntuación máxima de 5 se logró a las 72 horas en ‘papel de celulosa’ con una incidencia del [14.28%] para el grupo de machos y un [42.85%] para el grupo de hembras. Durante el envejecimiento, se observó patrones temporales de tipo progresivo y una disminución de nidos perfectos en los ratones 3xTg-AD en ambos géneros y en el grupo de ratones NTg en ambos géneros se observaron patrones temporales bifásicos y solo en el grupo de ratones NTg hembras de 12 meses de edad, a las 48h ya había construidos nidos perfectos con una incidencia del [100%] como se detalla en la Tabla 7.

En cambio, la construcción del nido con material de ‘algodón’ era exactamente el mismo independientemente del grupo de animales estudiados donde no se observaron efectos genotipo, género, edad e interacción [todos las $F_{(1,62)} > 1.689$, *n.s.*].

Con el material de ‘algodón’ todos los grupos de animales siguieron el mismo curso temporal con un patrón bifásico donde se observó efecto tiempo/horas [$F_{(2,124)} = 41.779$, $P < 0.001$] pero no mostró efecto de interacción [$F_{(2,124)} > 1.689$, *n.s.*]. Además, hubo una incidencia del [100%] donde todos los animales NTg y 3xTg-AD realizaron nidos perfectos a las 48 horas.

Además, realizando una prueba *t* para datos pareados, indicó que la calidad del nido construido con el material de ‘algodón’ en los ratones 3xTg-AD de 6 meses de edad era mayor que cuando utilizaban el material de ‘papel de celulosa’ para cada intervalo de tiempo tanto en el grupo de machos [todas las $t_{(6)} < -4.583$, $P < 0.001$] como en el grupo de hembras [todas las $t_{(6)} < -2.649$, $P < 0.05$]. Asimismo, en la etapa avanzada de la enfermedad a los 12 meses los ratones 3xTg-AD en ambos géneros mostraron nidos perfectos con el material de ‘algodón’ con respecto al ‘papel de celulosa’ tanto en los machos [todas las $t_{(9)} < -2.390$, $P < 0.001$] como en las hembras [todas las $t_{(10)} < -2.449$, $P < 0.05$].

Estos resultados confirman los datos preliminares obtenidos en el (Experimento 1) que sugieren ausencia de diferencias en los factores genotipo y género en la conducta de anidación con material de ‘algodón’.

Sin embargo, también se observaron diferencias cualitativas en la aparición de la conducta de contacto con el material. Por lo tanto, la conducta de anidación con material de ‘algodón’ se estudió con más detalle analizando la latencia como se detalla en la Tabla 8.

Tabla 8. Latencia de contacto con el material de algodón

Latencia de contacto con el Algodón (min)	NTg (Media ± SEM)	3xTg-AD (Media ± SEM)
♂ 6 meses de edad	33.7 ± 16.6	74.5 ± 42.8*
♀ 6 meses de edad	2.28 ± 0.7	103.7 ± 37.2 *
♂ 12 meses de edad	2.2 ± 0.1 e	3.6 ± 0.1 * e
♀ 12 meses de edad	1.6 ± 0.2 d,e	3.0 ± 0.0 * d,e

Tabla 8. Latencia de contacto con el material de Algodón expresada en minutos, medias ± SEM. ANOVA, efecto genotipo $P < 0.01$, efecto edad $P < 0.01$, efecto interacción genotipo x edad $P < 0.01$, Post-hoc Dunca test * $P < 0.05$ vs. ratones NTg y ^e $P < 0.05$ vs. grupo de 6 meses de edad. Student *t*-test, ^d $P < 0.05$ vs. género (machos).

El análisis factorial indicó que la 'latencia de contacto con el material de algodón' mostró efecto genotipo [$F_{(1,62)} = 8.922, P < 0.001$], donde los ratones NTg de ambos géneros presentaron latencias entre 1.6 a 33.6 minutos, mientras que los ratones 3xTg-AD se retrasaban en el tiempo. También, se evidenció el efecto edad [$F_{(1,62)} = 17.593, P < 0.001$] donde los intervalos de tiempo eran 2 veces o incluso 20 veces mayor en los ratones 3xTg-AD de 6 meses de edad con respecto a los de 12 meses de edad. Asimismo, se observó efecto de interacción 'genotipo x edad' [$F_{(1,62)} = 8,229, P < 0.01$] que indicó que la relación con la edad disminuía la latencia de contacto, esta observación era 3 veces mayor en los ratones NTg y no se observó efecto género o interacción del género con los otros factores [todas las $F_{(1,62)} > 1.556, n.s.$].

Discusión

La conducta de anidación es un comportamiento específico de cada especie asociada a una interacción activa con el medio ambiente en busca de refugio y termorregulación. Se trata de una conducta dirigida que consiste en respuestas sensoriomotoras estereotipadas y controladas fundamentalmente por los niveles de excitación y motivación como la búsqueda de calor, seguridad o

crianza (Wesson, *et al.*, 2011). Se muestra tanto en machos como en hembras y en ambos contextos, parentales y no parentales (Filali, *et al.*, 2009).

Los cambios de la conducta de anidación han estado relacionados con trastornos de tipo neuropsiquiátricos como la ansiedad, conductas estereotipadas de tipo obsesivo compulsivo y han sido utilizadas para evaluar la validez predictiva de fármacos. La alteración de la conducta de nido también ha sido observable en modelos animales de esquizofrenia, depresión, síndrome de Rett y enfermedad de Alzheimer, así como también ratones mutantes en elementos bioquímicos o inmunológicos.

En este trabajo hemos caracterizado la conducta del nido en los 3xTg-AD y determinado la influencia de diferentes factores: genotipo, género, el estadio de la enfermedad, el tipo de estructura social y el material con el que se construyó el nido. Hemos estudiado el curso temporal de la construcción del nido durante 72 horas, utilizando dos diferentes materiales (papel de celulosa y algodón), en ambos géneros de los ratones 3xTg-AD y estadios de la enfermedad (temprana, 6 meses de edad y avanzado, 15 meses de edad) y en comparación con ratones no transgénicos de la misma edad y género. El estudio también aborda esta conducta desde un punto de vista etológico considerando las condiciones sociales de estabulación que varían desde la estructura social en grupo del mismo género, la estructura familiar con un componente maternal y el clásico pero forzado procedimiento de aislamiento usado en la mayor parte de los estudios. Se trata de la primera descripción de la conducta de nido en los ratones 3xTg-AD que, por otra parte, ha sido estudiada escasamente en otros modelos animales para la enfermedad de Alzheimer, en realidad solo en dos: APP^{swe}/PS1 (Filali *et al.*, 2009 a,b y 2011) y Tg2576 (Deacon *et al.*, 2008 y Wesson *et al.*, 2011).

Los resultados indican que los ratones 3xTg-AD tienen un patrón etológico de construcción del nido alterado que depende de varios factores. Cuando la

conducta de ambos genotipos se estudia en estructuras parentales que utilizan algodón se observa un curso temporal bifásico alcanzando, en ambos casos, el valor máximo de la escala Deacon a las 48h. Sin embargo, cuando el material era ‘papel de celulosa’ la calidad del nido de los 3xTg-AD aumenta de forma lineal pero no llega alcanzar el valor máximo de 5. Por lo tanto el déficit en la construcción del nido en estructuras parentales de 3xTg-AD depende del material que se les proporciona para hacer el nido, siendo solo observables con el ‘papel de celulosa’.

Esta es la primera vez en la que se evalúa el curso temporal, por lo que lo hemos valorado en dos tipos de material: ‘papel de celulosa’ y ‘algodón’, mientras que diversos autores lo hacen en animales aislados o en grupo y analizan la calidad del nido a las 24 horas. Cuando hemos evaluado la construcción del nido con el material de algodón a las 24 horas no encontramos diferencias significativas en la construcción del nido. Sin embargo, estudios con animales APPswe/PS1 (Filali *et al.*, 2009 a,b y 2011) y Tg2576 (Wesson *et al.*, 2011) han observado déficits en la calidad del nido a las 24h con material de algodón.

No obstante, cuando se observó la construcción del nido con papel de celulosa en los ratones 3xTg-AD encontramos diferencias en la calidad del nido con respecto a su control, ya que se observaron nidos planos y material esparcido por un cuarto de la superficie del suelo en las jaulas de los 3xTg-AD. Estos resultados se constatan con los observados en los ratones Tg2576 donde las diferencias con el material de papel fueron más significativas con respecto al algodón e indicaron que los resultados eran independientes del género y la edad de los animales (Wesson *et al.*, 2011).

En investigaciones con animales 3xTg-AD a partir de 2.5 meses de edad se ha observado una reducción de la conducta exploratoria en la prueba del campo y una pérdida del interés y la novedad en la pruebas de Boisser de 16 agujeros,

pero cuando la actividad espontanea se evalúa en un ambiente menos estresante aumenta la actividad (Giménez-Llort *et al.*, 2007). Por lo tanto, esto sugiere que los cambios en la actividad y/o déficits son debidos a la conducta de ansiedad y están condicionados al nivel de ansiedad que genera la prueba.

Otros autores han estudiado la conducta de anidación en grupos de igual género, donde han observado que los déficits en la conducta de anidación con material de algodón ya se encuentran presentes a los 3 meses de edad en ratones Tg2576, sin embargo, esto no era evidente cuando los ratones eran aislados debido que no mostraban déficits en la construcción del nido (Deacon *et al.*, 2008). Por esta razón, se decidió valorar la conducta de anidación en ratones machos y hembras aislados y en estadios de la enfermedad temprana, 6 meses de edad y avanzado, 15 meses de edad.

En el presente trabajo, en los ratones aislados, el curso temporal de la construcción del nido con material de 'papel de celulosa' fue bifásico en los ratones NTg y 3xTg-AD de 6 meses de edad independientemente del género. A los 12 meses de edad se encontró el mismo patrón temporal en los NTg, sin embargo, en los ratones NTg hembras de 12 meses se observó un patrón temporal bifásico alcanzado la máxima puntuación a las 48 horas y en los ratones 3xTg-AD de 12 meses en ambos géneros mostraron un patrón temporal progresivo sin alcanzar el máxima puntuación a las 72 horas. Cuando hemos estudiado la calidad del nido con material de 'algodón' con la escala de 5 puntos (Deacon, 2006) no se observaron diferencias significativas en los NTg y 3xTg-AD en ambos géneros ni en distintas etapas de la enfermedad. Sin embargo, cuando se evaluaron otras variables como la latencia de contacto con el material de 'algodón' si se observaron diferencias entre genotipos y edad de los animales. Estudios con animales 3XTg-AD hembras de 12 meses de edad tampoco han observado diferencias en la calidad del nido con material de 'algodón' (Filali *et al.*, 2012), sin embargo, estudios con animales APPswe/PS1 (Filali *et al.*, 2009) han observado que los déficits en la calidad del nido con

material de algodón se presentan a partir de los 6 meses de edad y se mantienen a los 12 meses de edad. Asimismo, estudios con el modelo de ratón Tg2576 (Wesson, *et al.*, 2011) han indicado que la calidad del nido en animales aislados no está asociada a la termorregulación y pueden estar relacionados a síntomas neuropsiquiátricos de la EA como: apatía, falta de interés en el entorno, pérdida de iniciativa o curiosidad y disminución de actividades espontáneas (Koh, *et al.*, 2008).

Investigaciones de aislamiento social con ratones durante la vejez, han mostrado un declive cognitivo y funcional, con aumento de la neofobia y la ansiedad y déficit en el aprendizaje y la memoria (Arranz, *et al.*, 2009). En general, las disfunciones ejecutivas pueden estar asociadas a los déficits en la interacción social, como también, las diferencias parecen depender de la variabilidad como cualquier otro test etológico que implica conducta espontánea.

Los resultados de este Estudio 2 sugieren que la observación de la construcción del nido puede ser un factor que condiciona respuestas afectivas (ansiedad, agresividad y estrés) y respuestas conductuales como de tipo ejecución. Además, con el material de 'papel de celulosa' es posible observar tanto diferencias de tipo genotipo como edad o dos fases de la enfermedad en la construcción del nido en las estructuras parentales y en aislamiento social. Además, el test de la construcción del nido puede ser de gran utilidad para la detección preclínica de tratamiento para la enfermedad de Alzheimer y otras enfermedades neurodegenerativas.

Conclusiones

Las conclusiones del Estudio 2 para la *Caracterización de la conducta de anidación en ratones 3xTg-AD y NTg*, en ambos géneros, a los 6 y 12 meses de edad, fueron las siguientes:

1. Cuando se estudia el patrón de la construcción del nido con 'algodón' en estructuras parentales a los 6 meses de edad y en ambos genotipos, se observa un curso temporal bifásico, alcanzando el valor máximo de la escala Deacon a las 48h. Sin embargo, cuando el nido se construye con 'papel de celulosa' el patrón en los 3xTg-AD es progresivo y no llega a alcanzar el valor máximo. Por lo tanto, las estructuras parentales de ratones 3xTg-AD muestran un déficit en la construcción del nido que depende del material siendo solo observable con el 'papel de celulosa'.
2. Como en el caso de las estructuras parentales, en los ratones 3xTg-AD aislados, de 6 y 12 meses de edad y en ambos géneros, el patrón de construcción del nido con 'papel de celulosa' presenta alteraciones en el curso temporal y la calidad del nido con respecto al de sus respectivos controles NTg y no se observa diferencia alguna cuando los animales usan 'algodón'.
3. El patrón de construcción de nido con 'papel de celulosa' en ratones 3xTg-AD a los 6 meses de edad fue bifásico y alcanzó su valor máximo a las 48h como en los animales NTg de su misma edad y género, pero los animales fueron incapaces de construir nidos perfectos, siendo el género masculino el que mostró las diferencias más significativas respecto a sus controles NTg.
4. A los 12 meses de edad y en comparación con ratones NTg de ambos géneros, los ratones 3xTg-AD mostraron un patrón de construcción de nido

con 'papel de celulosa' progresivo en lugar de bifásico, alcanzaron su valor máximo a las 72 horas en lugar de las 48h y el género femenino fue el que mostró las diferencias más significativas respecto a sus controles NTg.

Estudio 3: Caracterización del fenotipo basal y vulnerabilidad inducida por el antipsicótico risperidona

Estudio 3. Caracterización del perfil cognitivo y tipo SCPD en los ratones 3xTg-AD y NTg a los 12 meses de edad

El estudio 3 pretende modelar en los ratones 3xTg-AD la vulnerabilidad que conlleva un incremento de la mortalidad observada en los pacientes con EA tratados crónicamente con antipsicóticos atípicos como la risperidona. Antes de poder abordar este modelado definimos el fenotipo de partida de los sujetos de estudio. Con este fin, los animales fueron evaluados en una batería de pruebas para medir actividad exploratoria, ansiedad, aprendizaje y memoria, ritmo circadiano e incorporamos nuevos tests para evaluar respuestas que todavía no están descritas para los ratones 3xTg-AD como la desesperanza conductual, la conducta de enterramiento de objetos y la conducta social. En este último caso, el estudio 1 nos sirvió para seleccionar entre las múltiples pruebas disponibles la más completa y sensible. Se hizo también una valoración del estado basal de la glucosa y de la respuesta de tolerancia a ella cuando se administra intraperitonealmente.

Materiales y Métodos

Sujetos experimentales

Se eligieron animales machos de 12 meses que se corresponden con la manifestación de síntomas asociados a la fases avanzadas de la enfermedad (Oddo *et al.*, 2003). El experimento se llevó a cabo con un total de 52 ratones machos NTg y 3xTg-AD.

Diseño experimental y protocolos

El diseño experimental consistió en dos grupos experimentales: uno de machos 3xTg-AD de 12 meses de edad correspondiente a la fase avanzada de la enfermedad conformado por 28 animales y otro de 24 machos NTg de la misma edad como grupo control. La caracterización conductual se desarrolló aplicando

la batería experimental detallada en la Tabla 9, administrada a lo largo de 6 semanas consecutivas.

Tabla 9. Batería de tests conductuales y de tolerancia a la glucosa

Batería de tests	NTg ♂ 12 meses	3xTg-AD ♂ 12 meses
<i>Semana 1</i> Prueba de neofobia		
<i>Semana 2</i> Prueba del campo abierto Laberinto en T Actimetría de 24 h	24	28
<i>Semana 3</i> Prueba de neofobia		
<i>Semana 4</i> Test de natación forzada Test de interacción social		
<i>Semana 5</i> Laberinto en T Laberinto acuático de Morris		
<i>Semana 6</i> Test de enterramiento de mármoles Test de tolerancia a la glucosa Control semanal de peso Control diario de supervivencia		
Total		52

Capacidad exploratoria y conducta de ansiedad

En este apartado se incluyen diferentes pruebas que valoran la capacidad exploratoria del animal en un entorno nuevo y/o desconocido: la prueba de neofobia y el campo abierto.

Prueba de las esquinas o neofobia (CT)

Esta prueba estudia el comportamiento de los animales en un entorno nuevo al sacarlos de la jaula donde se encuentran junto al resto de ratones y transferirlos

a una nueva jaula de plástico estándar de tipo Macrolon® (35x35x25cm) con 200 ml de viruta como las utilizadas para su estabulación.

La prueba tiene una duración de 30 segundos durante los cuales se estudia la actividad exploratoria horizontal representada con el número de esquinas visitadas y actividad vertical representadas con el número de levantamiento y la latencia de aparición del primer levantamiento. La conducta de levantamiento corresponde al alzamiento del animal sobre dos patas, de modo que se sostiene con las patas traseras y mantiene las delanteras apoyadas en la pared del aparato o bien en el aire. Se utiliza una jaula para cada animal para evitar interferencias de olores en la conducta de los animales.

Prueba del campo abierto (OF)

Inmediatamente después de la prueba de neofobia se realiza la prueba del campo abierto, que consiste en un tablero de dimensiones (55x55x21cm) dividido en 25 cuadrantes de 10 x 10cm, con una iluminación de 25W. Las variables estudiadas fueron: la latencia del primer movimiento, el tiempo en abandonar el punto central, el tiempo de entrada en periferia y la distancia horizontal recorrida evaluada con el software SMART, Panlab, S.L. En la actividad locomotora vertical se incluyen la latencia del primer levantamiento y el número total de los mismos. La conducta de acicalamiento comprende la latencia del primer acicalamiento, así como el número y tiempo total de los mismos. Finalmente, se estudió la presencia de orina y de bolas fecales. Los 16 cuadrantes que componen el perímetro del tablero se consideran “cuadrantes externos” y los restantes “cuadrantes internos”. La duración de la prueba son 5 minutos y comienza cuando se coloca al animal en el centro del tablero, de espaldas al investigador.

Actividad circadiana

Actimetría de 24h. (ACT)

Consiste en un sistema de cajas equipadas con células fotoeléctricas que detectan el movimiento y permiten el estudio de la actividad tanto horizontal como vertical (Panlab, SL, Barcelona, España).

Los animales se colocan en jaula de plástico estándar de tipo Macrolon® (35x35x25cm) similares a las utilizadas como jaulas de estabulación, teniendo acceso a comida y agua *ad libitum* durante todo el periodo. Cada jaula se coloca encima de una placa de actimetría conectada a un ordenador que permite medir el nivel de movimientos o actividad motora espontánea de los animales a intervalos de tiempo prefijados por el experimentador, en este caso de 30 minutos. La actividad motora de 4 animales de genotipos distintos (distribución contrabalanceda) es evaluada de forma continua durante un ciclo de luz-oscuridad de 23 horas a partir de las 08:30 h. hasta las 07:30 h del día siguiente. Los resultados se recogen en un ordenador contiguo, mediante la utilización de un software especializado (Actitrack, PANLAB, SL, España).

Desesperanza conductual

Test de natación forzada (FST)

Se administra como mínimo 72 h antes del laberinto acuático de Morris, (Porsolt, *et al.*, 1977). Consiste en colocar cada animal individualmente en un cilindro de plástico con unas dimensiones 21cmx23cm de diámetro y con 20cm de agua templada a 25 grados centígrados.

Cada animal es testado durante 6 minutos. La conducta del animal fue grabada con una video cámara suspendida del techo de la sala por encima de los cilindros. Se tomara medidas para evitar todos aquellos elementos que interfieren potencialmente: la posición del observador y la orientación del

aparato. Asimismo, el test se lleva a cabo manteniendo la temperatura de la habitación constantemente cálida entre 22-24°C.

Las jaulas con todos los animales que participan en el test se trasladan a la sala experimental entre 15 y 30 minutos antes de iniciar el test para que se habitúen a la sala. Pasados los 6 minutos de la prueba, se sacan a los animales de los cilindros y se les deja secar delante de una estufa. La conducta medida es la cantidad de tiempo que los animales están inmóviles flotando en el agua.

En el test se valoran tres criterios conductuales:

1. Inmovilidad: movimientos mínimos para mantener la cabeza fuera del agua.
2. Natación: movimiento de las cuatro patas con el cuerpo alineado horizontalmente en el agua.
3. Escalar o escape (*Climbing*, en inglés): movimiento de las cuatro patas con el cuerpo alineado verticalmente en el agua.

Conducta social

Test de interacción social en un ambiente nuevo (TIS)

En este estudio 3 se usó el mismo protocolo que ya detallamos en la página 62 del estudio 1. Brevemente: Las conductas sociales medidas durante los 5 minutos del test fueron la investigación social, la inactividad social y la cola vibrante mientras que las conductas no-sociales de tipo competitivas evaluadas fueron la exploración, el enterramiento y el acicalamiento.

Aprendizaje y memoria

Laberinto en T (TM)

El aparato consiste en un laberinto en T de madera lacada en negro con tres brazos (30x5x20cm) unidos por una plataforma central (5x5cm) en forma de T. Se utiliza para medir la memoria de trabajo a través de la alternancia espontánea de los brazos realizada por los animales.

En el momento de iniciar la prueba se coloca al ratón en el extremo del brazo largo y con la cabeza dirigida hacia la pared. No se emplea ningún tipo de refuerzo. La prueba consiste en cronometrar el tiempo en que el animal tarda en cruzar con las patas traseras la intersección de los dos brazos. Asimismo, se registra el tiempo que tarda el animal en explorar los tres brazos del laberinto parámetro que hemos denominado “Eficiencia Exploratoria”. Además, se analiza la presencia de orina y bolas fecales.

Laberinto acuático de Morris (MWM)

El laberinto acuático de Morris es una prueba de aprendizaje y memoria no condicionado utilizado por excelencia en la caracterización de modelos animales para déficits cognitivos que permite ejecutar una variedad de paradigmas para evaluar distintos procesos y aspectos del aprendizaje y la memoria.

Las distintas pruebas o paradigmas (*place task for reference memory, removal*) se realizan en un tanque de 1-1,5m de diámetro que se llena de agua a 25-27°C hasta una altura de 60cm. El agua se mantiene opaca añadiendo ‘pintura de dedos’ (Abacus, S.L.) que es de uso infantil habitual en guarderías y por tanto no tóxica. De forma general este tipo de pruebas se basan en que el animal ha de aprender a encontrar una plataforma sumergida bajo el nivel del agua, orientándose con los objetos que hay alrededor del tanque (puertas, ventanas, pósters). Los entrenamientos consisten en la administración de varios ensayos cada 15 minutos. El animal se introduce en el agua desde un punto cardinal distinto cada vez y ha de localizar la plataforma en un tiempo máximo de 1 minuto transcurrido el cual, si el animal no ha conseguido hallarla el experimentador lo lleva y lo deja en ella durante 20 segundos. El nivel de aprendizaje y memoria del animal se valora mediante las curvas de adquisición que expresan el tiempo medio (cronómetro) o la distancia media (software SMART, Panlab, S.L.) que tardan los animales de un grupo experimental en

encontrar la plataforma durante los cuatro ensayos de cada una de las sesiones que componen un paradigma (que ha de disminuir progresivamente). Después de este entrenamiento (*place task for reference memory*) los otros paradigmas que le siguen implican la desaparición de la plataforma (*removal*) en los que también se miden latencias (cronómetro), distancias y el paso por una determinada zona del laberinto (software SMART, Panlab, S.L.).

Cuando finaliza el test el animal es colocado en una jaula cerca de una fuente de calor seco (calor sin ventilador de aire) para facilitar el secado del pelaje. Durante el test, la temperatura de la habitación es constantemente monitorizada y mantenida a 22-24°C.

Conducta de enterramiento de mármoles

Test de enterramiento de mármoles (MBT)

Esta prueba se utiliza para evaluar la eficacia de los fármacos antipsicóticos en modelos animales a partir de cambios conductuales en la conducta de enterramiento.

Consiste en colocar un ratón en una jaula de plástico estándar tipo Macrolon® (35x35x25cm) similares a las propias, sin tapa; con una capa de serrín de 5cm. En el interior de la jaula se distribuyen 10 cuadrados de dimensiones (1cm x 1cm) de color amarillo, azul, rojo y verde formando 4 filas. Los ratones se introducen en las cajas por un período de 30 minutos. Las variables que son valoradas son: el número de cuadrados que se encontraron cubiertos más de dos tercios por el serrín (Bruins *et al.*, 2008) que fueron modificadas por número de mármol intacto, cambiado de posición y enterrado.

Test de tolerancia a la glucosa administrada intraperitonealmente (IPGTT)

Consiste en una inyección intraperitoneal de glucosa como un modelo para evaluar tanto la tolerancia a la glucosa como la estimulación de la secreción de insulina *in vivo*. Después de un ayuno nocturno, los ratones son pesados y

seguidamente son inyectados con una solución de 2mg de glucosa/kg del peso corporal. Las muestras de sangre se toman de una incisión realizada en la punta de la cola. La presión de la respuesta plasmática se establece a partir de mediciones a distintos tiempos: a los 15, 30, 60 y 120 minutos después de la inyección intraperitoneal de glucosa.

Peso corporal

La curva de peso de los animales se establece con los datos recopilados mensualmente. Además, antes de cada prueba conductual los animales son pesados para estandarizar la manipulación y el nivel de emotividad ante las pruebas. Estas medidas adicionales de peso tienen un valor añadido como indicadores del estado de salud del animal.

Análisis estadístico

Los resultados se expresan como promedios \pm error estándar de la media (SEM) y porcentajes. Se realiza el análisis estadístico con el software SPSS® versión 15.0; <http://www.spss.com>, Chicago, EEUU.

Las comparaciones para muestras independientes entre dos grupos se realizan con el Student's *t*-test. En todas las pruebas, $P < 0.05$ es considerado estadísticamente significativo.

En todos los casos, los datos se obtienen por observación directa con soporte video-computarizado (Programa SMART, Panlab, S.L.) que permite realizar medidas retrospectivas (p.ej. cálculo de las distancias recorridas) de las imágenes del animal realizando los tests. La precisión y fiabilidad que aporta el análisis computarizado de las trayectorias de los animales es crítico (e irrealizable manualmente) en pruebas de aprendizaje y memoria como por ejemplo las del laberinto acuático. En la actimetría el aparato dispone de células fotoeléctricas para cumplir esta función.

Resultados

Capacidad exploratoria y conducta de ansiedad

En la Tabla 10 se detallan los resultados obtenidos en las diversas pruebas conductuales que miden la capacidad exploratoria y la conducta de ansiedad.

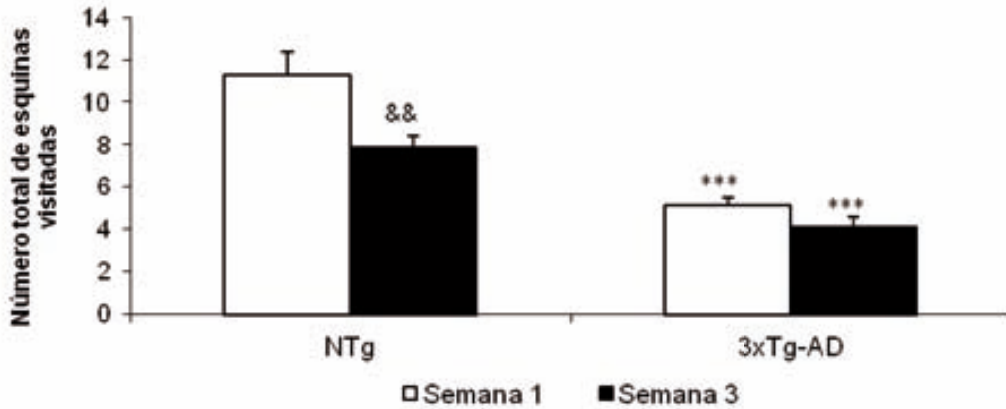
Tabla 10. Capacidad exploratoria y conducta de ansiedad

PRUEBAS CONDUCTUALES	NTg	3xTg-AD
	Promedio ± SEM n=24	Promedio ± SEM n=28
PRUEBA DE LAS ESQUINAS O NEOFOBIA		
Número de esquinas visitadas		
Semana 1	11,25 ± 1,12	5,10 ± 0,42***
Semana 3	7,87 ± 0,53	4,10 ± 0,46***
Latencia del 1er levantamiento (s)		
Semana 1	7,66 ± 0,93	14,32 ± 1,70**
Semana 3	7,70 ± 1,47	10,57 ± 1,64
Número de levantamientos		
Semana 1	6,54 ± 0,86	2,5 ± 0,40***
Semana 3	6,08 ± 0,68	2,53 ± 0,36***
PRUEBA DEL CAMPO ABIERTO		
Actividad exploratoria horizontal		
Latencia del primer movimiento (s)	5,45 ± 0,92	5,32 ± 0,69
Latencia de abandonar el punto de salida (s)	16,70 ± 4,48	16,60 ± 3,16
Latencia en entrar en Periferia (s)	31,45 ± 7,46	39,35 ± 7,09
Distancia total recorrida (cm)	2589,94 ± 235,6	1704,59 ± 118,57**
Distancia total / Número de levantamiento	219,17 ± 89,56	1483,82 ± 991,13
Actividad exploratoria vertical		
Latencia del 1er levantamiento (s)	37,25 ± 6,78	64,03 ± 12,75
Número de levantamiento: 1 ^{er} minuto	4,58 ± 0,65	1,64 ± 0,30***
Número de levantamiento: 2 ^{do} minuto	5,25 ± 0,85	2,35 ± 0,45**
Número de levantamiento: 3 ^{er} minuto	4,625 ± 0,57	2,17 ± 0,46**
Número de levantamiento: 4 ^{to} minuto	5,08 ± 0,69	2,35 ± 0,33**
Número de levantamiento: 5 ^{to} minuto	5,04 ± 1,23	2,5 ± 0,49*
Número total de levantamiento	23,62 ± 2,57	11,03 ± 1,54***
Comportamiento de Acicalamiento		
Latencia de acicalamiento (s)	155 ± 11,75	198,85 ± 14,81*
Número total de acicalamientos	2,58 ± 0,45	2,03 ± 0,55
Presencia de defecación y orina		
Número total de bolas fecales	2,79 ± 0,294	3,03 ± 0,28
Número total de orina	0,08 ± 0,05	0,5 ± 0,09**

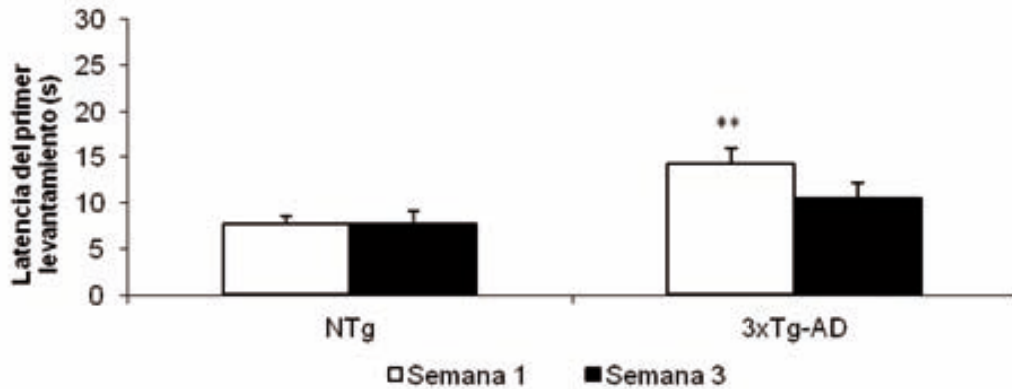
Capacidad exploratoria y conducta de ansiedad: Prueba de neofobia y prueba del campo abierto. Student's *t*-test; ****P*<0.001, ***P*<0.01y **P*<0.05.

Prueba de neofobia

6a



6b



6c

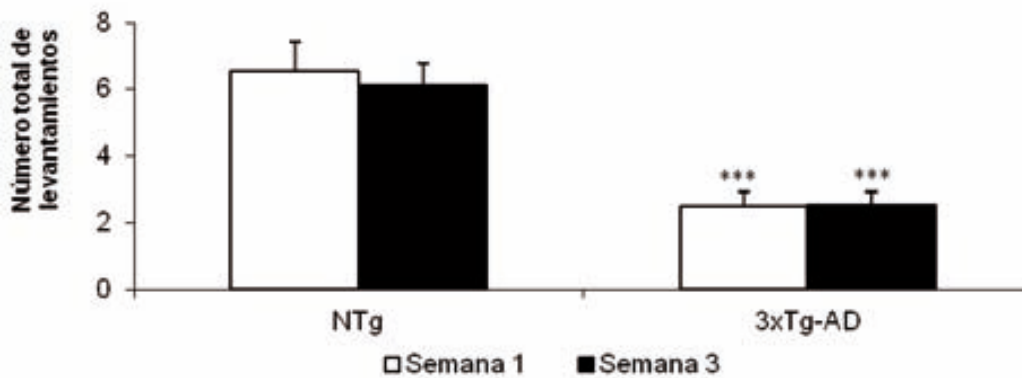


Figura 6. Prueba de Neofobia. a, Número total de esquinas visitadas; b, latencia del primer levantamiento (s) y c, número de levantamiento. Student's *t*-test; *** $P < 0.001$ y ** $P < 0.01$. *t*-test para datos pareados, && $P < 0.01$.

Prueba de las esquinas o neofobia (CT)

En el test de neofobia, la comparación para muestras independientes indicó que los tres componentes conductuales evaluados en la prueba: ‘número de esquinas visitadas’, ‘latencia del primer levantamiento’ y ‘número de levantamiento’ presentaron diferencias significativas entre los grupos NTg y 3xTg-AD durante la semana 1 y también la semana 3 (ver Tabla 10).

Los ratones NTg realizaban un promedio aproximado de ‘número de esquinas visitadas’ entre 11 y 8, además la ‘latencia del primer levantamiento’ apareció a los 7 s y referente al ‘número de levantamiento’ realizaban un promedio aproximado entre 7 y 6, tanto en la semana 1 como en la semana 3 (Figura 6).

Este patrón se encontró alterado en los ratones 3xTg-AD tanto a lo que se refiere a la latencia de aparición del ‘levantamiento’ como el número de episodios de ‘esquinas visitadas’ y ‘levantamientos’. En los ratones 3xTg-AD se observó una disminución de la actividad vertical y horizontal con respecto a su grupo control. En los ratones 3xTg-AD se observaron diferencias significativas en la aparición de la conducta de latencia de ‘levantamiento’ retrasándose en el tiempo, debido que se observó entre los 10 y 14 s.

La comparación para muestras independientes indicó diferencias significativas entre el grupo 3xTg-AD y NTg en las variables de ‘número de esquinas visitadas’ tanto en la semana 1 como en la 3 [todas las $t < -5.423$, gl 50, $P < 0.001$], en ‘latencia del primer levantamiento’ en la semana 1 [$t = -3.263$, gl 50, $P < 0.01$] y en el ‘número de levantamiento’ tanto en la semana 1 como en la semana 3 [todas las $t < 4.721$, gl 50, $P < 0.001$] (Figura 6a, b y c).

Al comparar las variables de la prueba de las esquinas al principio y al final de la caracterización basal realizando una prueba t para datos pareados solo mostró diferencias en el grupo de ratones NTg en la variable ‘número total de

esquinas visitadas' [$t=3.401$, gl 23, $P<0.01$] debido a que se observó una disminución del número de esquinas visitadas en la semana 3 (Figura 6a).

Prueba del campo abierto (OF)

Las variables del campo abierto se analizaron con la comparación para muestras independientes. En las Figuras 7a hasta las 7e se ilustra el patrón normal de las conductas en la que se evalúan cuatros aspectos: 'actividad exploratoria horizontal', 'actividad exploratoria vertical', 'comportamiento de acicalamiento' y 'presencia de defecación y orina'. Estas conductas presentan latencias de aparición y número de episodios distintas en función del genotipo (Tabla 10). En los ratones NTg la variable de 'distancia recorrida' y 'levantamiento' indicó que estos ratones realizaban mayor actividad exploratoria horizontal y vertical durante la prueba (Figura 7b y 7c). Del mismo modo, se observó que la 'latencia de acicalamiento' apareció a los 2m58s, mientras que se observó una disminución de la presencia de 'defecaciones y orina'.

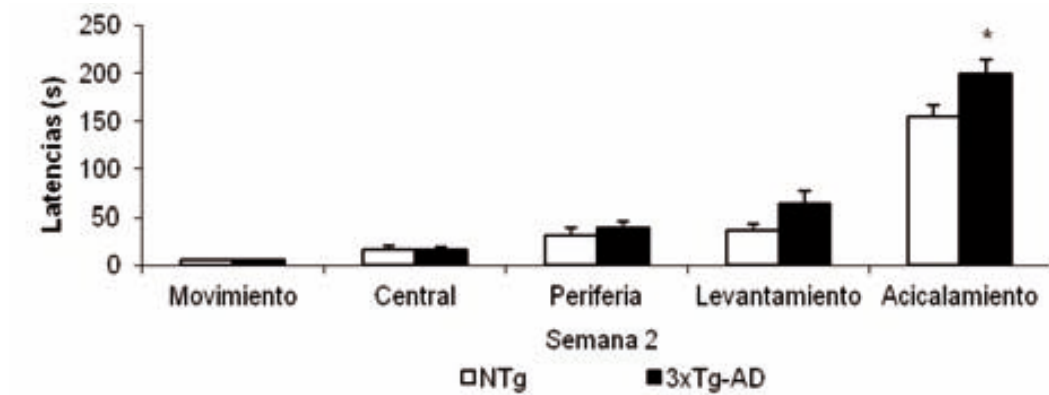
Este patrón se encontró alterado en los ratones 3xTg-AD, donde la comparación para muestras independientes indicó diferencias significativas entre el grupo 3xTg-AD y NTg en la variable de 'número total de levantamientos' donde se observó una disminución de esta conducta [$t= 4.338$, gl 50, $P<0.001$] (Figura 7c y 7d) y en la variable de 'distancia recorrida' se destacó una disminución de actividad exploratoria en los ratones 3xTg-AD [$t= 3.503$, gl 50, $P<0.01$] (Figura 7b). Referente a la conducta de 'acicalamiento' se observó que aparece de forma más tardía en el tiempo en los ratones 3xTg-AD con respecto a su grupo control NTg, siendo un indicativo de la disminución del cuidado personal [$t= -2.266$, gl 50, $P<0.05$] (Figura 7a).

Otros indicadores de emotividad son las medidas de las defecaciones y orina realizadas durante el test. Cuando se estudiaron estos comportamientos se observó un aumento de incidencia de orina en los ratones 3xTg-AD con

respecto a su grupo control NTg [$t = -3.564$, $gl = 50$, $P < 0.01$] tal como se ilustra en la Figura 7e.

Prueba del Campo Abierto

7a



7b

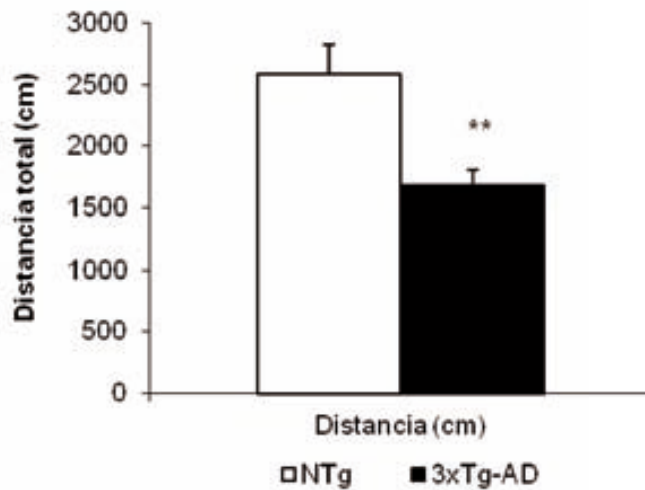
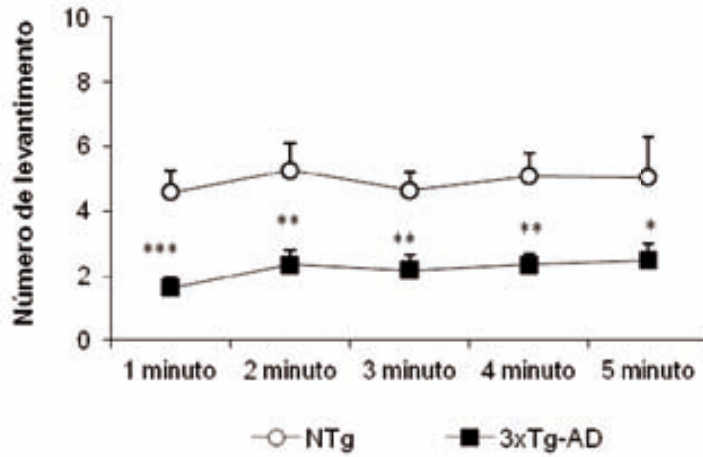
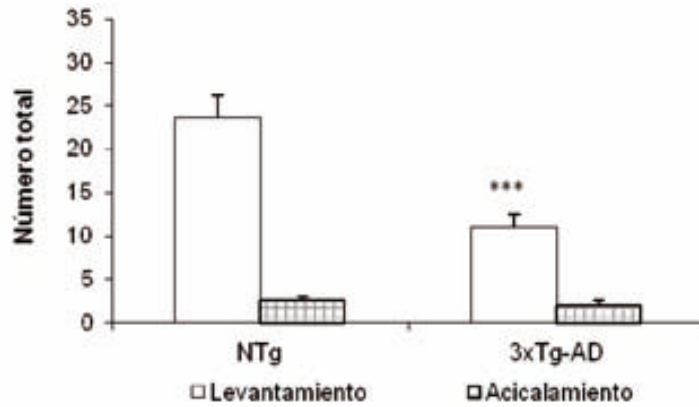


Figura 7. Prueba del campo abierto. a, latencias (s) y b. Distancia total. Student's *t*-test; ** $P < 0.01$ y * $P < 0.05$.

7c



7d



7e

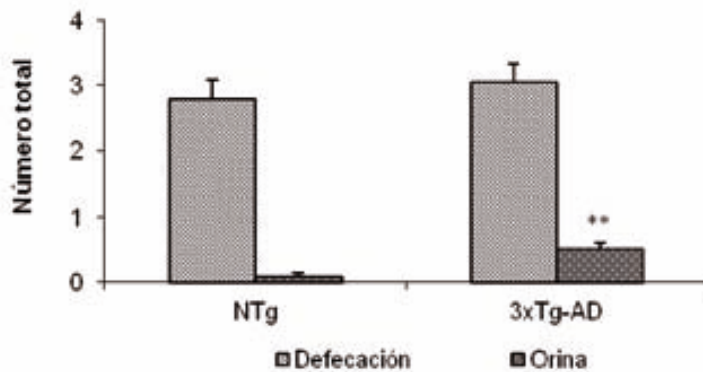


Figura 7. Prueba del campo abierto (cont.). c, número de levantamientos; d, número total y e, número total de defecaciones y orina. Student's *t*-test; *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$ y * $P < 0.05$.

Actividad circadiana

Actimetría de 24h. (ACT)

La actimetría fue utilizada para evaluar la actividad motora a lo largo del ritmo circadiano de los dos grupos de animales en un ciclo de 24h. La actividad empezó a medirse a partir de las 8:30 de la mañana, media hora después del inicio del ciclo de luz. El cambio de luz a oscuridad fue a las 20:00h y el test finalizó a las 7:30 de la mañana siguiente, de manera que la duración total del test fue de 23h con 2 períodos de 11h30m cada uno.

Se determinó que el conteo del número de interrupciones de las células fotoeléctricas para actividad horizontal y para actividad vertical fuera para intervalos de 30 min (ver figuras 8a y 8b, 46 intervalos de 30 min en total) y a partir de estos datos se realizaron cálculos por intervalos mayores según la curva de actividad de los animales controles NTg que se observó a lo largo del test (ver figuras 8a y 8b y tabla 11).

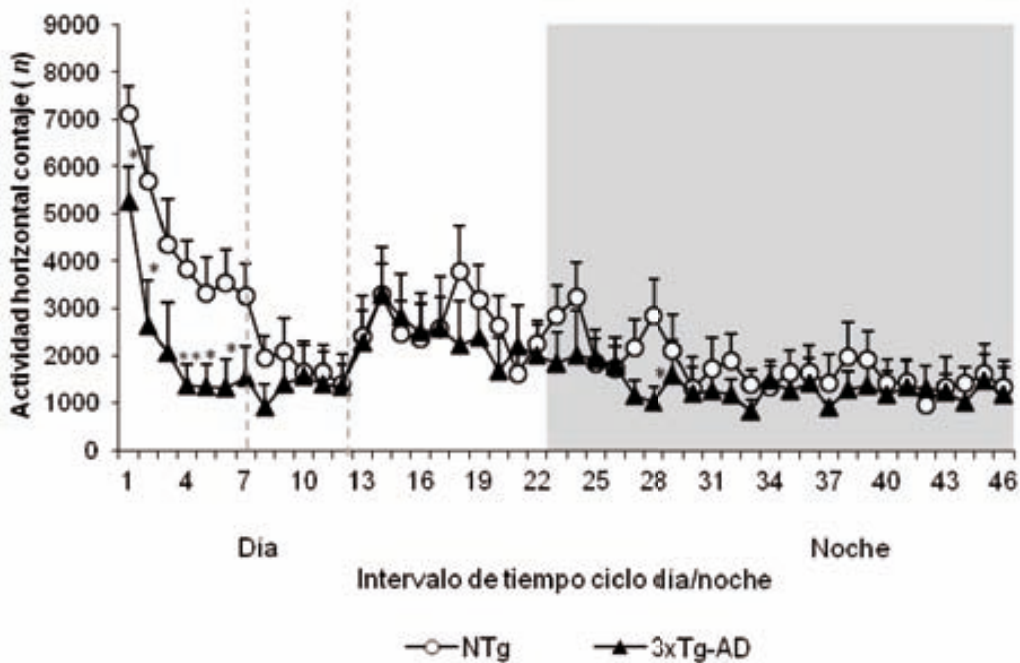
El primer valor analizado fue la '*cota 0*', una variable que hemos introducido conceptualmente y que hace referencia a los valores iniciales de actividad durante el primer intervalo o primera media hora de la prueba.

La variable '*período habituación*' incluyó los 7 primeros intervalos (incluye la *cota 0*) que corresponden a las tres primeras horas del test. A este período de actividad decreciente le sigue la '*etapa basal*', que incluye los intervalos 8 a 12, es decir a partir de la tercera hasta la quinta hora del test. El resto del período diurno hasta el cambio de luz a oscuridad recibió el nombre de '*etapa de activación motora*' ya que la actividad motora adquiere los niveles de actividad nocturna.

En el periodo de oscuridad no se hizo distinción entre intervalos ya que en la mayoría de los casos la evolución fue descendiente pero de forma continua.

Prueba del Ciclo Circadiano 'Actimetria 24h'

8a



8b

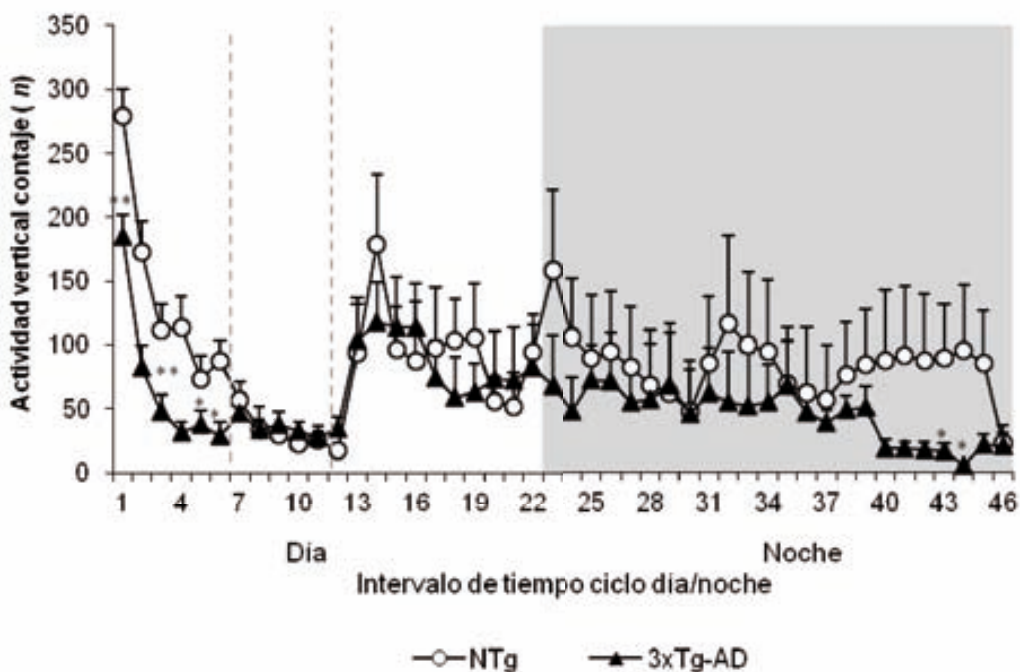


Figura 8. Prueba de actimetría. a, Contaje de actividad horizontal n y b, Contaje de actividad vertical. *Student's t*-test; ** $P < 0.01$ y * $P < 0.05$.

Tabla 11. Actividad circadiana

ACTIMETRIA 24H	NTg		3xTg-AD	
	Promedio ± SEM n=24		Promedio ± SEM n=28	
Período de análisis				
Cota 0 (8:30-9:00h)				
Contaje horizontal total (n)	7125,65	± 562,87	5268,88	± 717,69*
Contaje vertical total (n)	279,08	± 21,13	184,11	± 18,17**
Etapas de habituación (Intervalos 1-7, 8:30-11:30)				
Contaje horizontal total (n)	31141,77	± 4452,34	15516,32	± 4718,30*
Contaje vertical total (n)	893,04	± 118,66	457,89	± 55,55**
Contaje horizontal por hora (n/h)	10380,59	± 1484,11	5172,10	± 1572,76*
Contaje vertical por hora (n/h)	297,68	± 39,55	152,63	± 18,51**
Etapas basales (Intervalos 8-12, 11:30-14:00h)				
Contaje horizontal total (n)	8718,59	± 2755,79	6614,29	± 2941,94
Contaje vertical total (n)	127,91	± 14,65	165,71	± 26,18
Contaje horizontal por hora (n/h)	3487,43	± 1102,31	2645,71	± 1176,70
Contaje vertical por hora (n/h)	51,16	± 5,86	66,28	± 10,47
Etapas de activación motora (Intervalos 13-23, 14:30-19:30h)				
Contaje horizontal total (n)	29391,56	± 5636,11	25741,42	± 8698,05
Contaje vertical total (n)	1123,16	± 362,63	940,28	± 340,99
Contaje horizontal por hora (n/h)	8397,59	± 1610,31	3086,70	± 1313,28
Contaje vertical por hora (n/h)	320,90	± 103,61	268,65	± 97,42
Período diurno completo (Intervalos 1-23, 8:30-19:30h)				
Contaje horizontal (n)	69251,93	± 10270,78	47872,05	± 15096,16
Contaje vertical total (n)	2144,13	± 353,35	1563,89	± 362,98
Contaje horizontal por hora (n/h)	6021,91	± 893,11	4162,79	± 1312,71
Contaje vertical por hora (n/h)	186,45	± 30,73	135,99	± 31,56
Período nocturno completo (19:30-07:00h)				
Contaje horizontal (n)	39754,28	± 9110,89	30420,64	± 8242,64
Contaje vertical total (n)	1851,58	± 968,20	1011,00	± 474,10
Contaje horizontal por hora (n/h)	3456,89	± 792,25	2645,27	± 716,75
Contaje vertical por hora (n/h)	161,01	± 84,19	87,91	± 41,23
Relación noche/día				
Contaje horizontal total (n)	0,57	± 0,09	0,73	± 0,07
Contaje vertical total (n)	0,70	± 0,31	0,56	± 0,12
Período completo de actividad (8:30-7:30h)				
Contaje horizontal (n)	109006,21	± 16389,49	78292,69	± 23077,25
Contaje vertical total (n)	3995,71	± 1138,42	2574,89	± 826,70
Contaje horizontal por hora (n/h)	4739,40	± 712,59	3404,03	± 1003,36
Contaje vertical por hora (n/h)	173,73	± 49,50	111,95	± 35,94
Presencia de defecación durante las 24h				
Número total de bolas fecales	44,62	± 2,08	43,42	± 2,33

Actividad del ciclo circadiano durante 24h. Student's t-test; **P<0.01 y *P<0.05.

La curva de actividad circadiana de los ratones NTg (ver figura 8a y 8b) mostró varios periodos de actividad que fueron los que determinaron la forma de analizar el patrón de actividad motora horizontal y vertical. Este patrón se encontró alterado en los ratones 3xTg-AD. Así, la comparación para muestras independientes indicó una disminución de la actividad exploratoria horizontal respecto al grupo NTg en las variables para 'cota 0' y 'habituaación' [todas las $t > 1.987$, gl 50, $P < 0.05$] (Figura 8a). No hubo diferencias en los niveles de actividad basal, la etapa de activación motora, el período de actividad nocturna, la relación noche/día ni en el cómputo total de actividad durante todo el ciclo de luz estudiado [todas las $t < -1.400$, gl 50, *n.s.*]

En paralelo a la actividad motora horizontal, los animales 3xTgAD también mostraron una disminución de la actividad exploratoria vertical en la cota 0 y en la [$t = 3.428$, gl 50, $P < 0.01$] y en la 'etapa de habituaación' [$t = 3.479$, gl 50, $P < 0.01$]. En estos casos, la significación estadística con respecto a los valores registrados en animales NTg fue mayor que la obtenida en la actividad motora horizontal indicando que esta variable es más sensible para mostrar los cambios (Figura 8b).

La comparación para muestras independientes indicó diferencias significativas entre los animales 3xTg-AD y NTg en el intervalo 28 de la actividad exploratoria horizontal correspondiente al periodo nocturno, mostrando una disminución de la actividad exploratoria a los 811 minutos [$t = 2.317$, gl 50, $P < 0.05$] como se detalla en la Figura 9a. Además se observaron diferencias significativas entre los animales 3xTg-AD vs. NTg en los intervalos 43 y 44 de la actividad exploratoria vertical finalizando el periodo nocturno, indicando una disminución de la actividad exploratoria entre los 1261-1291 minutos [todas las $t < 2.174$, gl 50, $P < 0.05$] como se detalla en la Figura 8b.

El análisis de varianza con medidas repetidas indicó en los ratones NTg un efecto en el 'tiempo' en la variable 'habituaación' es decir, desde el intervalo 1-7

$[F_{(6,138)} = 16.087, P < 0.001]$ como en la variable de ‘activación motora, es decir desde el intervalo 13-46 $[F_{(33,759)} = 1.997, P < 0.001]$. En los 3xTg-AD se observó también efecto del ‘tiempo’ en la variable ‘habitación’ es decir, desde el intervalo 1-7 $[F_{(6,162)} = 20.691, P < 0.001]$ como en la variable de ‘activación motora, es decir desde el intervalo 13-46 $[F_{(33,891)} = 1.886, P < 0.001]$.

Desesperanza conductual

Test de natación forzada (FST)

El test de natación forzada tiene un tiempo de duración de 6 minutos, donde se valoran tres criterios conductuales que se distinguen: inmovilidad ‘*immobility*’, natación ‘*swimming*’ y escalar ‘*climbing*’.

Adicionalmente hemos analizado el tiempo del test en dos partes: parte 1, que corresponde desde el inicio de la prueba hasta el minuto 2 y parte 2, desde el minuto 2 hasta el minuto 6 para los tres criterios conductuales (Tabla 13 y Figura 10).

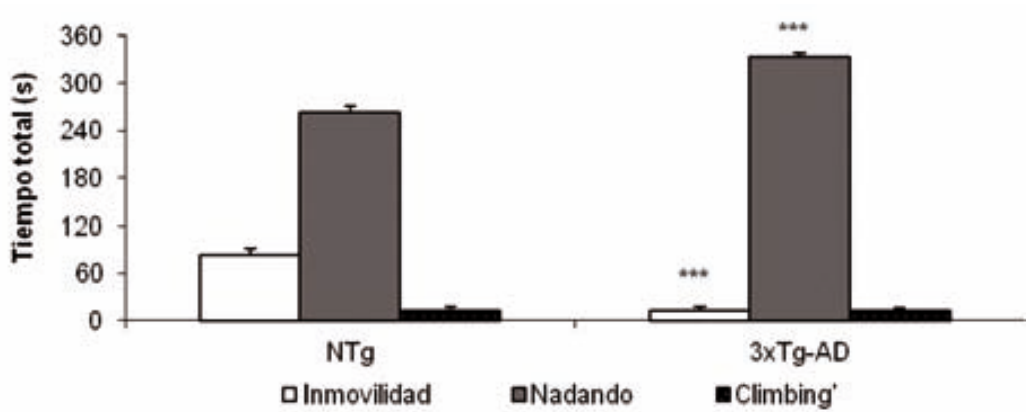
La comparación para muestras independientes indicó que con la excepción del ‘*climbing*’ los otros dos criterios conductuales que se distinguen: inmovilidad ‘*immobility*’, natación ‘*swimming*’ y escalar ‘*climbing*’, presentan tiempo de duración y porcentaje de episodios distinto en función del genotipo (Figura 9a-f y Tabla 12).

Tabla 12. Desesperanza conductual

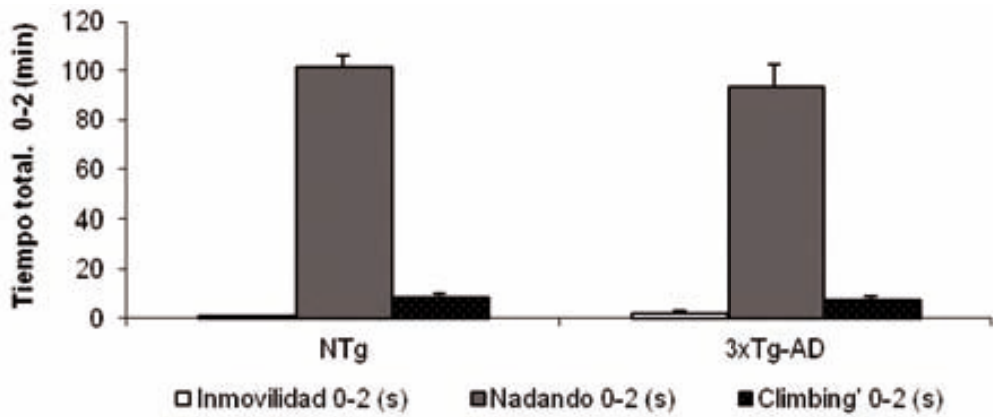
	NTg Promedio \pm SEM n=24	3xTg-AD Promedio \pm SEM n=28
TEST DE NATACIÓN FORZADA. Porsolt Test.		
Tiempo total de inmovilidad (s)	83,20 \pm 8,52	13,39 \pm 4,59***
Número total de episodios inmóvil	13,04 \pm 0,98	4,35 \pm 0,91***
Tiempo total nadando (s)	262,91 \pm 8,67	333,21 \pm 5,78***
Número total de episodios nadando	19,12 \pm 1,24	10,28 \pm 1,33***
Tiempo total de 'climbing' (s)	13,87 \pm 3,22	13,39 \pm 3,20
Número total de episodios de 'climbing'	5,66 \pm 0,71	5,14 \pm 0,89
Evaluación del tiempo por segundos		
Tiempo total de inmovilidad (s)		
Entre 0- 2 segundos	0,75 \pm 0,30	2 \pm 0,93
Entre 2- 6 segundos	82,45 \pm 8,45	11,46 \pm 4,43***
Número total de episodios inmóvil		
Entre 0- 2 segundos	0,58 \pm 0,24	0,67 \pm 0,24
Entre 2- 6 segundos	12,45 \pm 0,81	3,67 \pm 0,84***
Tiempo total nadando (s)		
Entre 0- 2 segundos	101,16 \pm 4,92	93,42 \pm 9,01
Entre 2- 6 segundos	160,41 \pm 10,44	237,64 \pm 10,22***
Número total de episodios nadando		
Entre 0- 2 segundos	4,5 \pm 0,60	3,60 \pm 0,51
Entre 2- 6 segundos	14,63 \pm 0,82	6,79 \pm 1,00***
Tiempo total de 'climbing' (s)		
Entre 0- 2 segundos	8,04 \pm 2,10	6,82 \pm 1,77
Entre 2- 6 segundos	5,83 \pm 1,57	6,60 \pm 1,87
Número total de episodios de 'climbing'		
Entre 0- 2 segundos	3,54 \pm 0,43	2,5 \pm 0,49
Entre 2- 6 segundos	2,12 \pm 0,37	2,5 \pm 0,54
Desesperanza conductual: Prueba de natación forzada. Student's t-test; *** P <0.001, ** P <0.01 y * P <0.05.		

Test de natación forzada.

9a



9b



9c

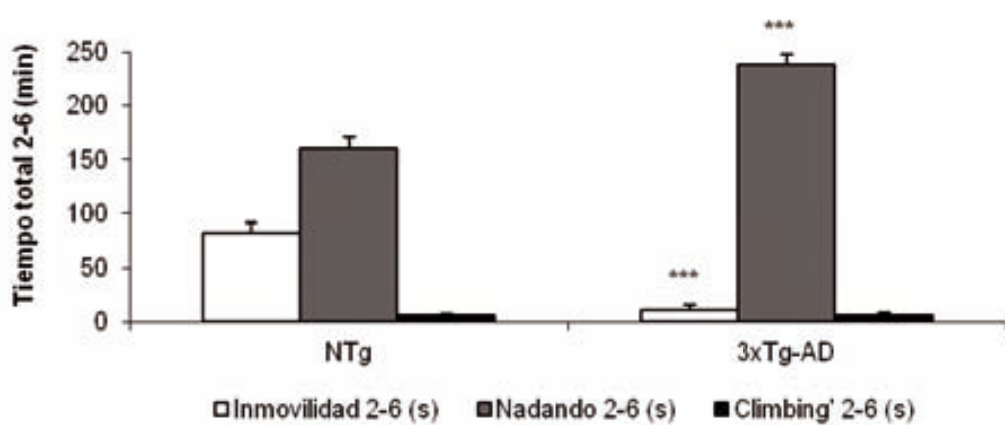
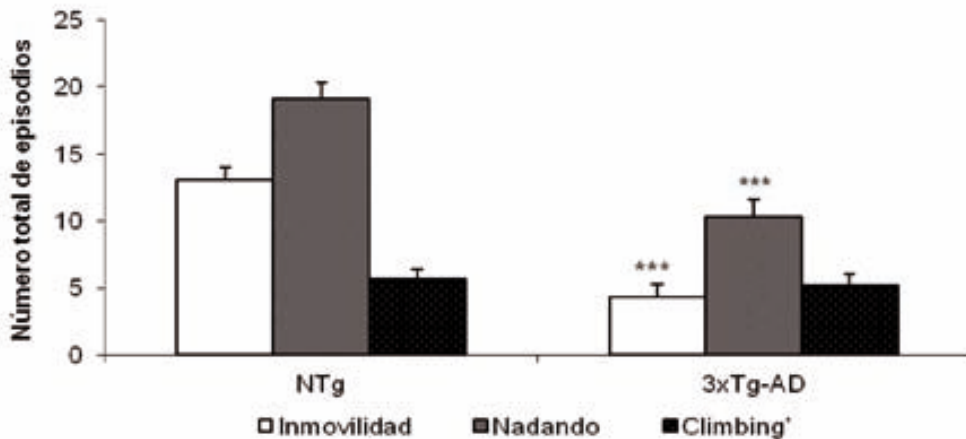
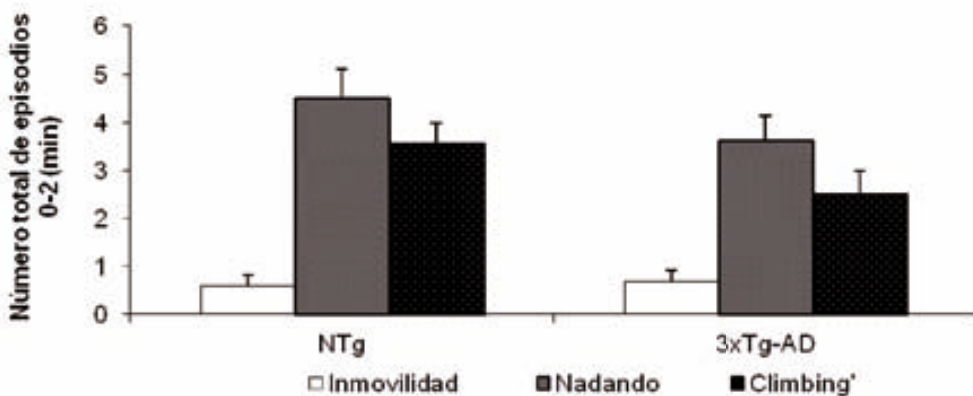


Figura 9. Test de natación forzada. a, Tiempo total (s), b, Tiempo total 0-2 (s); c, tiempo total 2-6 (s). Student's *t*-test; ****P*<0.001.

9d



9e



9f

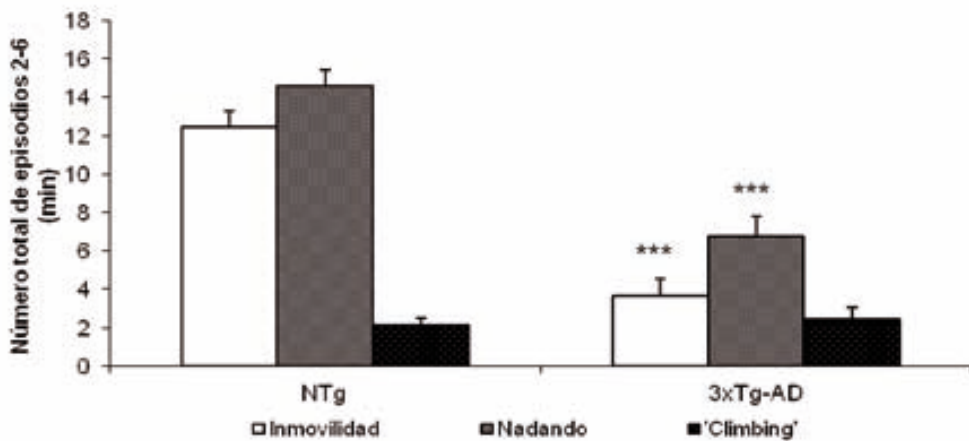


Figura 9. Test de natación forzada (cont.). d, número total de episodios (s), e, número total de episodios 0-2 (s) y f, número total de episodios 2-6 (s). Student's *t*-test; *** $P < 0.001$.

Durante los 6 minutos que duró la prueba conductual los ratones NTg mostraron un tiempo total de 'inmovilidad' de 1 minuto con 39 segundos y la conducta de 'natación' se encontró presente durante 4 minutos con 38 segundos aproximadamente. Este patrón se encontró alterado en los ratones 3xTg-AD. Así, la comparación para muestras independientes indicó una disminución del tiempo total de 'inmovilidad' [$t=7.492$, gl 50, $P<0.001$] y un aumento del tiempo total de 'natación' [$t=-6.913$, gl 50, $P<0.001$] respecto al grupo NTg (Figura 10a). Además en los ratones 3xTg-AD se observó una disminución del número de episodios de 'inmovilidad' [$t=6.496$, gl 50, $P<0.001$] así como de 'natación' [$t=-4.806$, gl 50, $P<0.001$] con respecto a su grupo control NTg (Figura 9a y 9d).

Cuando se evaluó la primera parte del test correspondiente desde el primer minuto hasta el minuto 2 no se observaron diferencias significativas en el tiempo ni en el número de episodios (Figura 9b y 9e).

Al analizar la 2 parte del test correspondiente desde el minuto 2 hasta el minuto 6 se observó una disminución del tiempo de 'inmovilidad' [$t=7.740$, gl 50, $P<0.001$] y un aumento de tiempo de 'natación' [$t=-5.260$, gl 50, $P<0.001$] en los ratones 3xTg-AD con respecto a su grupos control NTg. Asimismo, se observó en estos una disminución del número de episodios de 'inmovilidad' [$t=7.458$, gl 50, $P<0.001$] y 'natación' [$t=5.936$, gl 50, $P<0.001$] (Figura 9c y 9e) en comparación a los NTg (Figura 9c y 9f).

Conducta social

Test de interacción social en un ambiente nuevo (TIS)

En esta prueba se analizaron dos tipos de conductas: las sociales (Figura 10 y Tabla 13) y las no-sociales (Figura 11 y Tabla 13). La comparación para muestras independientes indicó que los cuatros componentes conductuales que se distinguen: 'contacto cara/cuerpo', 'contacto anogenital', 'cola vibrante' y 'agresividad', presentan latencias de aparición y duración distinta en función del

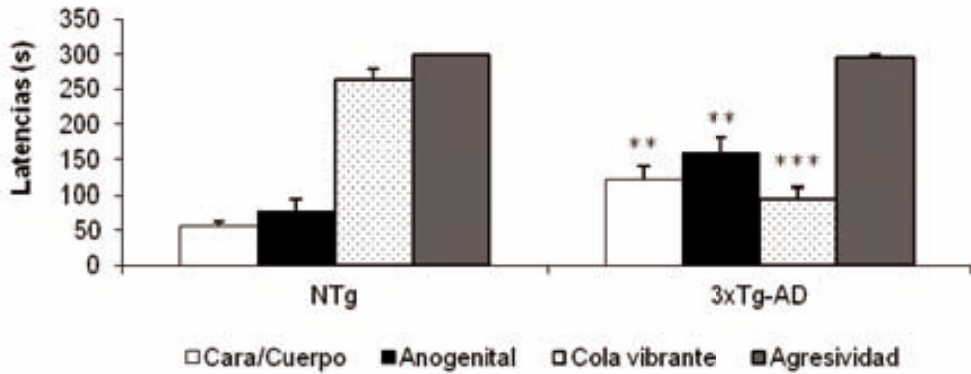
genotipo (Tabla 13). En las Figuras 10a, 10b y 10c se ilustran los patrones de conductas sociales que muestran los animales NTg y 3xTg-AD.

Tabla 13. Test de interacción social

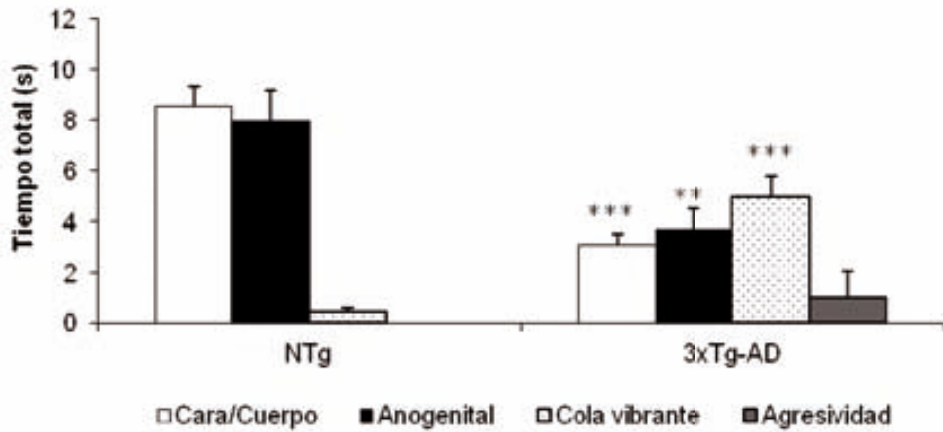
TEST DE INTERACCIÓN SOCIAL <i>Social Interaction Test</i>	NTg=24 Promedio ± SEM	3xTg-AD=28 Promedio ± SEM
Conducta social		
Contacto cara / cuerpo		
Latencia de contacto de cara/cuerpo (s)	55,75 ± 7,05	121,07 ± 19,18**
Tiempo total (s)	8,54 ± 0,79	3,10 ± 0,42***
Número total de episodios	5,75 ± 0,39	2,25 ± 0,27***
Contacto con cola		
Latencia del primer contacto con anogenital(s)	77,04 ± 17,05	159,60 ± 22,15**
Tiempo total (s)	7,95 ± 1,20	3,71 ± 0,81**
Número total de episodios	4,04 ± 0,55	2 ± 0,46**
Cola vibrante		
Latencia de vibración de cola (s)	263,5 ± 15,14	93,96 ± 17,87***
Tiempo total (s)	0,45 ± 0,17	4,96 ± 0,82***
Número total de episodios	0,45 ± 0,17	4,10 ± 0,63***
Contacto agresivo		
Latencia de contacto agresivo (s)	300 ± 0,00	296,39 ± 3,60
Tiempo total (s)	0,00 ± 0,00	1,03 ± 1,03
Número total de episodios	0,00 ± 0,00	0,14 ± 0,14
Tiempo total sin contacto	283 ± 1,69	287,07 ± 1,74
Conducta no-social		
Actividad vertical		
Latencia del primer levantamiento (s)	11,41 ± 2,88	28,78 ± 8,15
Número total de levantamiento	34,25 ± 2,11	21,85 ± 1,60***
Actividad horizontal		
Número total de esquinas	31,58 ± 2,37	17,89 ± 1,08***
Conducta acicalamiento		
Latencia de acicalamiento (s)	103,41 ± 11,88	118,39 ± 14,44
Número de total de acicalamiento	1,83 ± 0,22	2,17 ± 0,35
Conducta de enterramiento		
Latencia de enterramiento (s)	225,54 ± 15,41	189,92 ± 16,97
Número total de enterramiento	3,08 ± 0,88	8,75 ± 2,69
Conducta social: Test de interacción social en un ambiente nuevo. Student's <i>t</i> -test; *** <i>P</i> <0.001 y ** <i>P</i> <0.01.		

Conducta Social.

10a



10b



10c

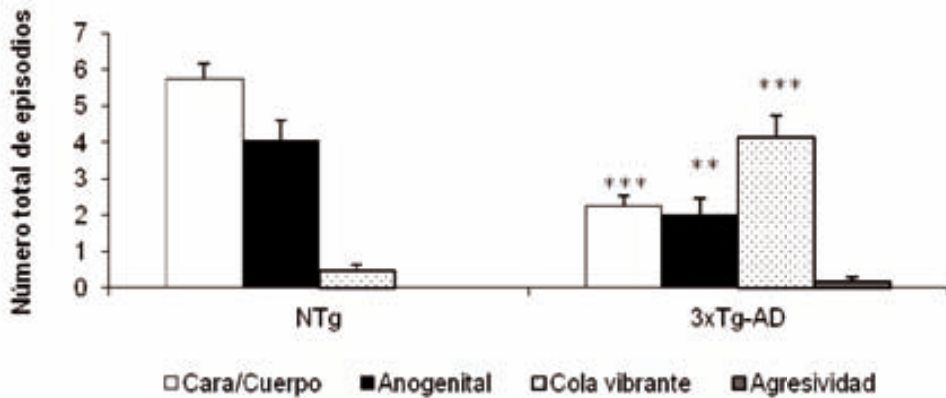


Figura 10. Conducta social. a, Latencias (s); b, tiempo total y c, número total de episodios. Student's *t*-test; ****P*<0.001 y ***P*<0.01.

Conductas sociales

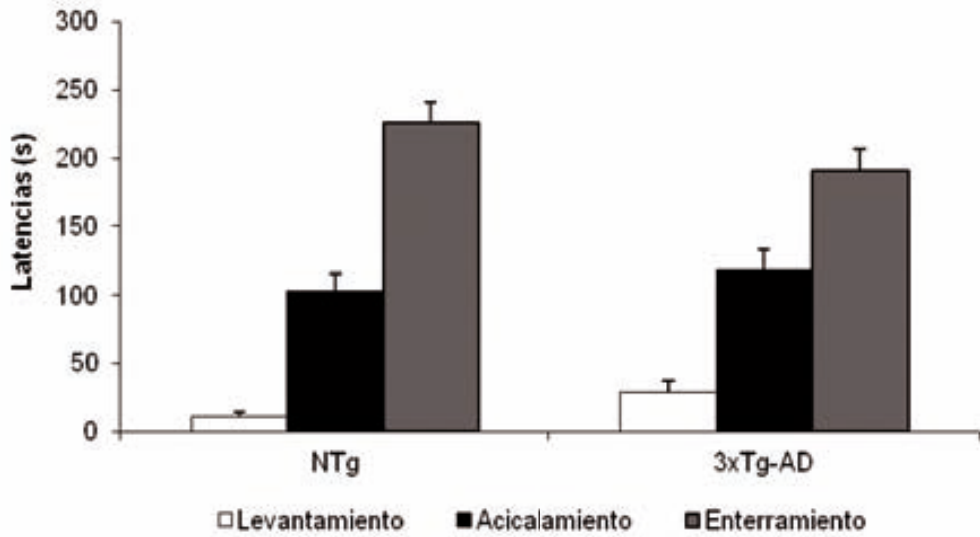
En los ratones NTg la conducta contacto 'cara/cuerpo' apareció durante el primer minuto, el 'contacto anogenital' se observó al minuto y medio y la 'cola vibrante' a los 4 minutos y medio. Este patrón se encontró alterado en los ratones 3xTg-AD tanto a lo que se refiere a la latencia de aparición como la duración (tiempo). Así, la comparación para muestras independientes indicó diferencias estadísticas en la aparición de la conducta 'contacto cara/cuerpo', [$t=-3.003$, gl 50, $P<0.01$], en la conducta 'anogenital' [$t=-2.879$, gl 50, $P<0.01$] y en la conducta 'cola vibrante' [$t=7.102$, gl 50, $P<0.001$], retrasándose en el tiempo en las dos primeras y adelantándose en la última (Figura 10a).

Estas diferencias en los ratones 3xTg-AD se ven también reflejadas en la variable de duración de la conducta 'contacto cara/cuerpo' [$t=6.262$, gl 50, $P<0.001$], 'anogenital' [$t=2.978$, gl 50, $P<0.01$] y en la 'cola vibrante' [$t=-4.962$, gl 50, $P<0.001$], donde se observó una disminución del tiempo total en las dos primeras y un incremento en la última con respecto a su grupo control NTg (Figura 10b).

Asimismo, en los ratones 3xTg-AD se observó una disminución del número de episodios en la conducta 'contacto cara/cuerpo' [$t=7.473$, gl 50, $P<0.001$], en la conducta 'anogenital' [$t=-2.853$, gl 50, $P<0.01$] y un aumento de la conducta 'cola vibrante' [$t=-5.180$, gl 50, $P<0.001$] (Figura 10c).

Conductas no-sociales.

11a



11b

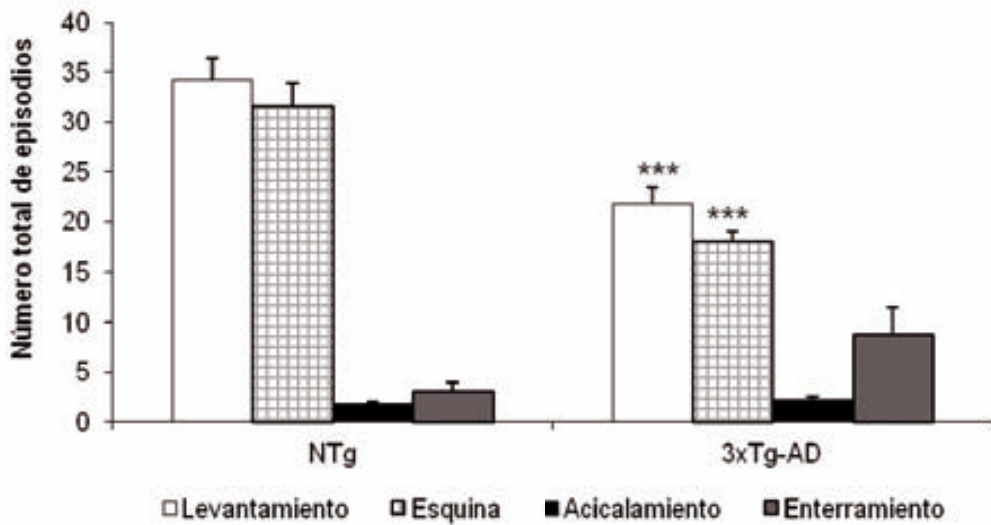


Figura 11. Conductas no-sociales. a, latencias (s) y b, número total de episodios. Student's *t*-test; *** $P < 0.001$.

Conductas no-sociales

Las conductas no-sociales se analizaron también con la comparación para muestras independientes, como en el caso anterior. En las Figuras 11a y 11b se ilustra el patrón normal de las conductas no-sociales, en las que se evaluaron cuatro aspectos: ‘levantamiento’, ‘esquina’, ‘acicalamiento’ y ‘enterramiento’. Estas conductas presentan latencias de aparición y número total de episodios distintas en función del genotipo (Tabla 13).

En los ratones NTg la conducta ‘levantamiento’ apareció durante los primeros 34 s, el ‘acicalamiento’ se observó en 1 minuto y 72 s y el ‘enterramiento’ apareció a los 3 minutos y 76 s. Este patrón de conductas no-sociales se encontró alterado en los ratones 3xTg-AD tanto a lo que se refiere a la latencia de aparición como el número de episodios. En los ratones 3xTg-AD se observaron diferencias estadísticas en el ‘número de levantamiento’ y en el ‘número de esquinas’ donde se observó una disminución de la actividad exploratoria vertical [$t=4.733$, gl 50, $P<0.001$] y en la actividad exploratoria horizontal [$t=5.490$, gl 50, $P<0.001$] (Figura 11b).

Aprendizaje y memoria

Laberinto en T (TM)

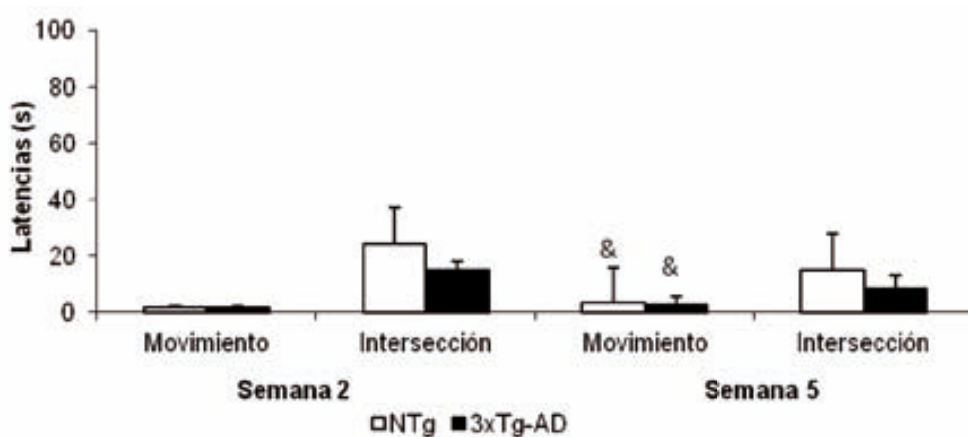
El laberinto en T fue utilizado para valorar la conducta de alternancia espontánea de los animales durante los 5 minutos de la prueba y que implica tanto actividad exploratoria, capacidad de afrontar situaciones de estrés como memoria de trabajo (Giménez-Llort *et al.*, 2010).

Tabla 14. Memoria de trabajo

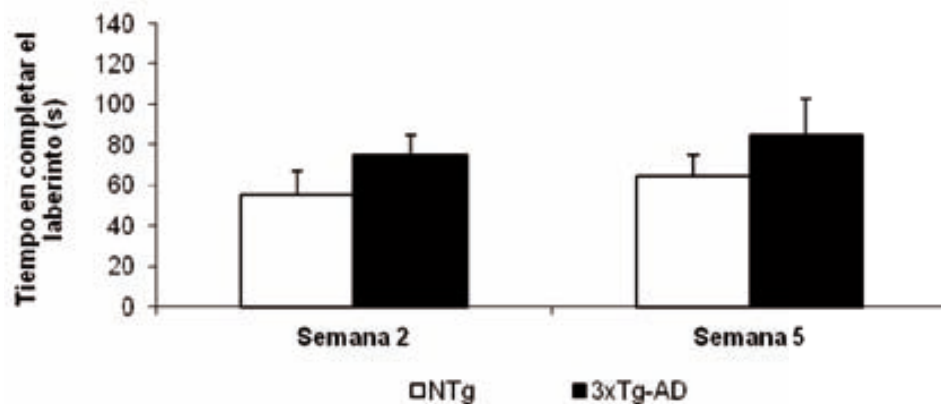
	NTg =24	3xTg-AD=28
	Promedio ± SEM	Promedio ± SEM
PRUEBA DEL LABERINTO EN T. <i>T Maze Test.</i>		
<i>Actividad exploratoria horizontal</i>		
Latencia de movimiento (s)		
Semana 2	1,62 ± 0,38	1,89 ± 0,38
Semana 5	3,37 ± 0,92	2,39 ± 0,43
Latencia en cruzar la intersección del laberinto (s)		
Semana 2	24,41 ± 12,63	15,07 ± 3,20
Semana 5	15,12 ± 3,50	8,42 ± 1,02
Eficiencia exploratoria en completar el laberinto (s)		
Semana 2	54,95 ± 11,85	64,75 ± 9,89
Semana 5	75 ± 10,16	85,14 ± 17,71
<i>Presencia de defecación y orina</i>		
Número total de bolas fecales		
Semana 2	0,375 ± 0,13	0,53 ± 0,18
Semana 5	1,12 ± 0,27	0,71 ± 0,21
Número total de orina		
Semana 2	0,08 ± 0,05	0,21 ± 0,07
Semana 5	0,08 ± 0,05	0,35 ± 0,09*
Memoria: Laberinto en T. Student's <i>t</i> -test; * <i>P</i> <0.05.		

Prueba del Laberinto en T

12a



12b



12c

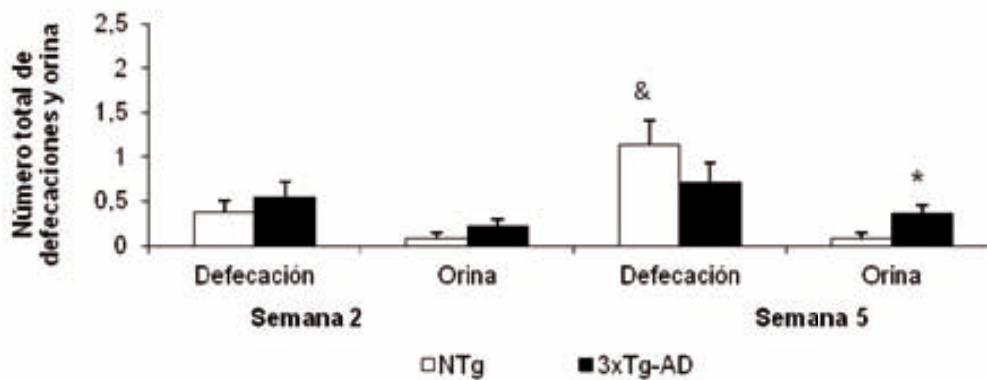


Figura 12. Prueba del laberinto en T. a, latencias (s); b, tiempo en completar el laberinto (s) y c, número total de defecaciones y orina. Student's *t*-test; * $P < 0.05$. *t*-test para datos pareados, & $P < 0.05$.

En ambos grupos los valores de la variables conductuales estudiadas fueron similares tal como se detalla en la Tabla 14.

La comparación para muestras independientes solo mostró diferencias significativas entre el grupo de ratones 3xTg-AD y en la variable de presencia 'orina' en la semana 5 [$t=-2.421$, gl 50, $P<0.05$] debido que se observó un incremento de la misma (Figura 12c).

Al comparar las variables de la prueba del laberinto en T al principio y al final de la caracterización basal realizando una prueba t para datos pareados mostró diferencias en el grupo de ratones NTg en la variable 'latencia de movimiento' [$t=-2.190$, gl 23, $P<0.05$] debido que se retrasaba en el tiempo y en el número de 'defecaciones' [$t=-2.1642$, gl 23, $P<0.05$] presentando un incremento de la misma. En los ratones 3xTg-AD se observó cambios significativos en la variable 'latencia de movimiento' [$t=2.136$, gl 27, $P<0.05$] debido que se retrasaba en el tiempo.

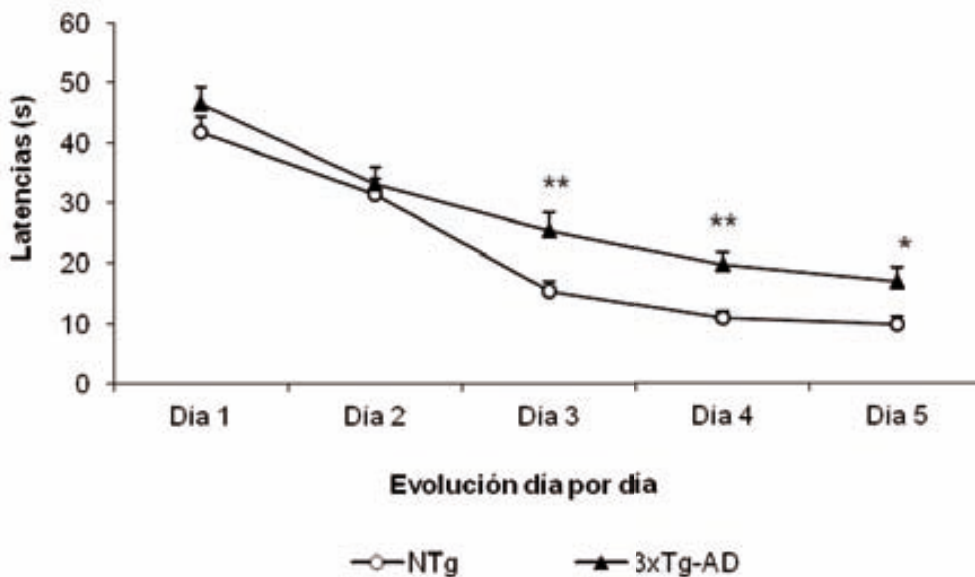
Laberinto acuático de Morris (MWM)

Con la finalidad de evaluar el aprendizaje y memoria se aplicó el laberinto acuático de Morris. En esta prueba se analizaron dos tipos de paradigmas para evaluar los distintos procesos y aspectos del aprendizaje: evolución día por día en inglés *place task for referent memory* y la eliminación de la plataforma en inglés *removal*. En los ratones NTg se observó que a partir del día 3 encuentran la plataforma a los 15 segundos y este tiempo se va disminuyendo progresivamente hasta el día 5 donde llegan a la plataforma a los 9 s (Figura 13a).

En el paradigma dos, que consistió en retirar la plataforma que se realizó en el día 5, se observó que los ratones NTg realizaron un promedio de 11 entradas en la zona donde se encontraba la plataforma (Figura 13b).

Laberinto acuático de Morris

13a



13b

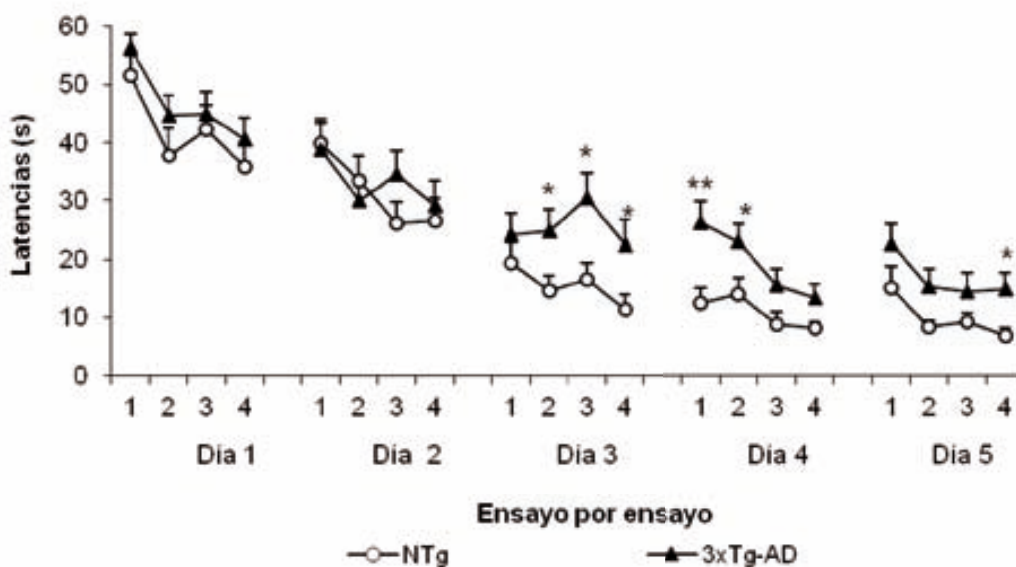
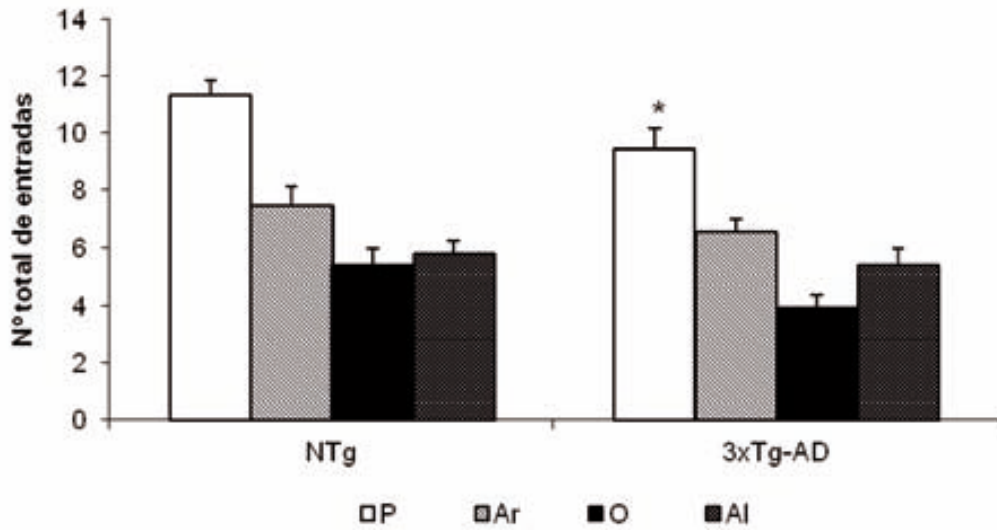


Figura 13a-b. Laberinto acuático de Morris: Paradigma de adquisición de la posición de la plataforma. a, Latencias (s), evolución del aprendizaje y memoria. b, latencias (s) evolución ensayo por ensayo (memoria a corto plazo). Student's *t*-test; * $P < 0.05$ y ** $P < 0.01$.

13c



13d

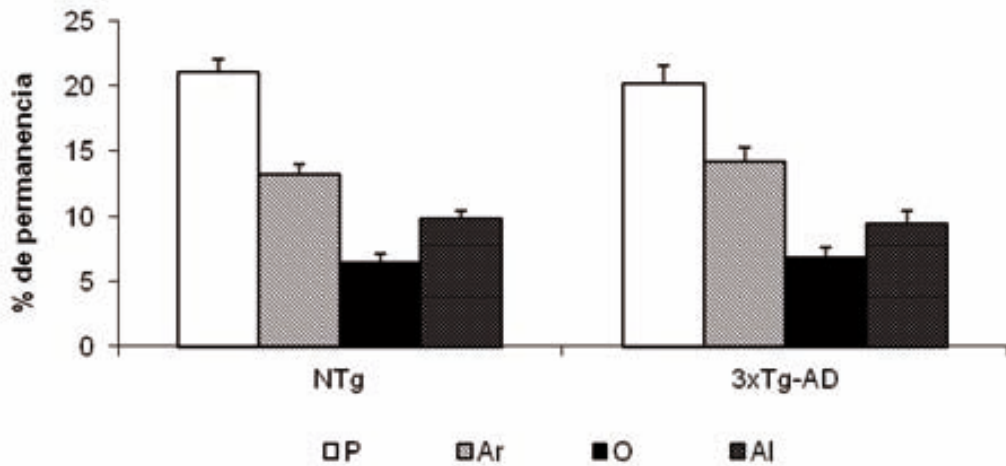


Figura 13c-d. Laberinto acuático de Morris: Paradigma de retirada de la plataforma. c, número total de entradas en el cuadrante: plataforma (P), derecho (Ar), opuesto (O) e izquierdo (Al) y d, porcentaje de permanencia en el cuadrante. Student's *t*-test; **P*<0.05.

El análisis de medida repetidas indicó efecto de tiempo/días en los ratones NTg [$F_{(4,44)} = 63.354$, $P < 0.001$] y en los ratones 3xTg-AD [$F_{(4,44)} = 40.236$, $P < 0.001$] como se observó en la Figura 13a.

En la prueba del laberinto acuático de Morris, la comparación para muestras independientes mostró diferencias significativas entre el grupo 3xTg-AD y NTg. En el paradigma evolución del aprendizaje y memoria 'día por día' se observó que los ratones 3xTg-AD en el día 3 y 4 empleaban mayor tiempo para encontrar la plataforma [todas las $t > -3,140$, gl 50, $P < 0.01$] y esta conducta se mantiene en el día 5 [todas las $t > -3,140$, gl 50, $P < 0.05$] (Figura 13a).

En el paradigma ensayo por ensayo que evalúa la memoria a corto plazo la comparación para muestras independientes indicó diferencias significativas entre el grupo de ratones 3xTg-AD y el grupo de ratones NTg en el ensayo 2,3 4 del día 3 [todas las $t > 0.390$, gl 50, $P < 0.05$], en el ensayo 1 y 2 del día 4 [todas las $t > 0.390$, gl 50, $P < 0.05$] y en el ensayo 1 del día 5 [todas las $t > 0.390$, gl 50, $P < 0.05$] debido que los ratones 3xTg-AD se tardaban más en encontrar la plataforma con respecto a su grupo control.

Asimismo, al retirar la plataforma se observó que los ratones 3xTg-AD realizaban menor número de entradas en la zona donde se encontraba la misma [$t = 2.058$, gl 50, $P < 0.05$] (Figura 13c)

Conducta de enterramiento de mármoles

Test de enterramiento de mármoles (MBT)

En esta prueba se valoró la conducta de enterramiento en los animales donde se evaluó el número de interacciones del animal con los mármoles y se especifican según la escala de interacción creciente: número de 'mármoles intactos', 'cambio de posición' y 'enterrados'.

En los ratones NTg se observó que de los 10 mármoles empleados para la prueba un promedio de 4 se encontró cambiado de posición y un promedio de 1 se observó ‘enterrados’ (Figura 14).

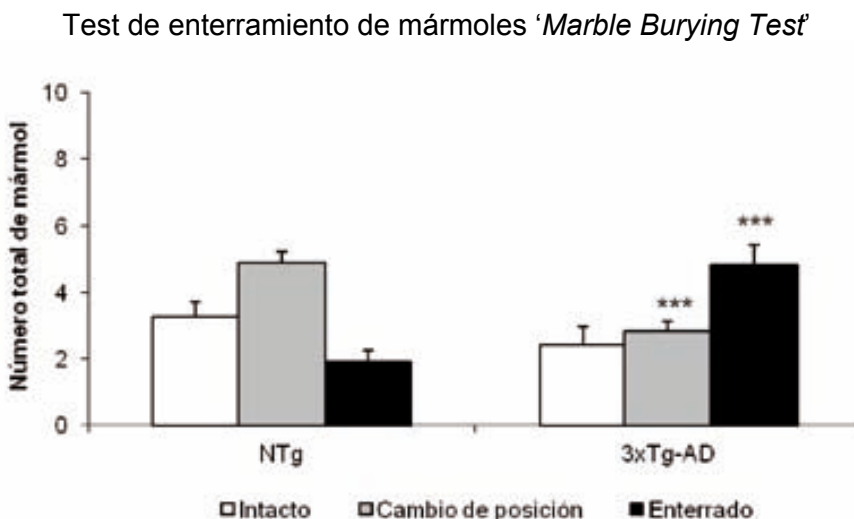


Figura 14. Test de enterramiento de mármoles ‘*Marble Burying Test*’. Número total de mármol: intacto, cambio de posición y enterrado. Student’s *t*-test; *** $P < 0.001$.

La comparación para muestras independientes mostró diferencias significativas entre el grupo 3xTg-AD y NTg. Donde se observó que el patrón conductual de ‘cambio de posición’ y ‘enterrados’ se encontró alterado en los ratones 3xTg-AD indicando una disminución en el primero [$t=4.309$, gl 50, $P < 0.001$] y un aumento en el último [$t=-4.041$, gl 50, $P < 0.001$]

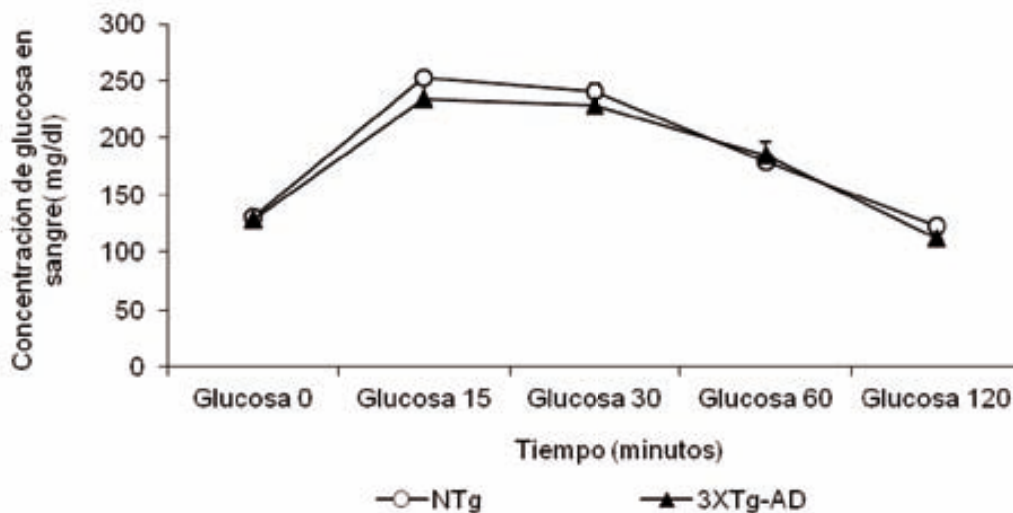
Test de tolerancia a la glucosa intraperitoneal (IPGTT)

En esta prueba se evaluó la respuesta de los animales a la tolerancia a la glucosa. La prueba se analizó en dos partes: 1, evaluar la concentración de glucosa en sangre desde el estado basal hasta los 120 minutos (Figura 15a) y 2, evaluar la concentración en sangre en ‘valores relativos’, es decir, después de restar el valor basal al de los tiempos de 15, 30, 60 y 120 minutos donde a este proceso se le llamo ‘valores relativo’ (Figura 15b).

En ambos grupos los valores de la tolerancia a la glucosa fueron similares [todas las $t < -0.390$, *n.s.*] tal como se ilustra en la Figura 15a y 15b.

Test de tolerancia a la glucosa intraperitoneal 'IPGTT'

15a



15b

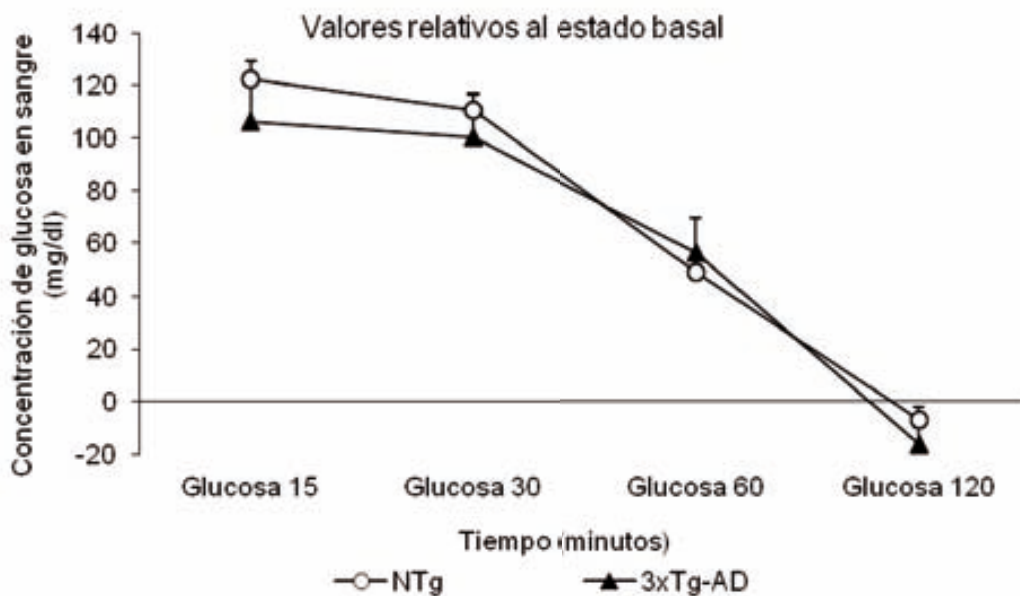


Figura 15. Test de tolerancia a la glucosa intraperitoneal 'IPGTT'. a, concentración de glucosa en sangre (s) y b, valores relativos de concentración de glucosa en sangre.

Discusión

En esta primera parte del estudio 3 nuestro objetivo fue describir el perfil conductual y cognitivo, las actividades de la vida diaria y la condición física /vital de ratones machos 3xTg-AD de 12 meses de edad, en comparación con animales NTg del mismo género y edad. De esta manera podíamos valorar distintos aspectos del fenotipo de estos animales en estadios neuropatológicos avanzados de la enfermedad antes de empezar el tratamiento crónico con risperidona que había de servir para el modelado animal de la vulnerabilidad inducida por antipsicóticos en los pacientes de Alzheimer.

Partiendo de la *conducta social* caracterizada en el estudio 1, ampliamos la caracterización de los animales 3xTg-AD en los *tests de la natación forzada* y el *test* Marble o de conducta de enterramiento de mármol, que no habían sido descritas en estos animales hasta el momento. Por tanto, la batería de test evaluó aspectos cognitivos (aprendizaje y memoria), de tipo SCPD (alteraciones en la actividad exploratoria del animal, los comportamientos de ansiedad, el ciclo circadiano, la desesperanza aprendida, la interacción social, la conducta de enterramiento) y actividades de la vida diaria (el acicalamiento). Además se valoró la tolerancia a la glucosa (IPGTT, en inglés) para determinar la posibilidad de que un trastorno del metabolismo de la glucosa fuera subyacente a la vulnerabilidad inducida por el antipsicótico que había de valorarse en la segunda parte del estudio.

Si el modelado de la pérdida de la memoria característico en la EA en ratones transgénicos ha sido un desafío, la validez de estos modelos animales con respecto a síntomas no cognitivos ha sido una meta aún más difícil de conseguir (revisado por Giménez-Llort *et al.*, 2007). La paranoia y el delirio, las alucinaciones, las alteraciones de la actividad, la agresividad, los trastornos del ritmo circadiano, los trastornos afectivos, los trastornos de la conducta social, la ansiedad y las fobias, todas ellas son alteraciones conductuales que se pueden

observan en pacientes con la enfermedad de Alzheimer y que conforman lo que clínicamente se denominan síntomas conductuales y psicológicos de la demencia (SCPD). Alteraciones neurológicas como las crisis epilépticas y alteraciones conductuales tales como la neofobia, el aumento de la agresividad o la hiperactividad locomotora a menudo se han descrito en varios tipos de ratones transgénicos para la enfermedad de Alzheimer (Janus y Westaway, 2001; Giménez-Llort *et al.*, 2007).

Test de las esquinas

En esta caracterización conductual, empezamos con la prueba de neofobia que mide el temor de un animal a lugares y/o elementos nuevos. En estudios previos, ya habíamos observado que la neofobia está incrementada en ratones 3xTg-AD hembras de 12 meses (Giménez-Llort *et al.*, 2007) y ahora reproducimos este incremento de neofobia también a esta misma edad en el género masculino.

El incremento de neofobia se mostró como una reducción de la actividad exploratoria horizontal y vertical, siendo el número de 'esquinas visitadas' y el número de 'levantamientos' las variables más sensibles para medir este incremento. La variable temporal 'latencia de levantamiento' fue igual de sensible que las variables cuantitativas de ocurrencia de los dos eventos (visitar una esquina o levantarse) en el primer test, pero perdió sensibilidad cuando esta prueba volvió a repetirse en la tercera semana de estudio a modo de seguimiento, habiendo realizado por el medio un campo abierto. Aún así, la conducta de neofobia fue una respuesta consistente ya que la significación obtenida en las variables cuantitativas que miden el número de eventos pudo volver a ser observada en tests repetidos. Esta consistencia en la respuesta neofóbica contrasta con la atenuación de respuestas ansiosas que se obtiene al repetir el test en otras pruebas similares (Giménez-Llort *et al.*, 1995). Es probable que la presencia en la caja de un lecho de serrín aporte un mayor valor mnemónico de novedad o de reconocimiento de lo familiar, en este caso en el ámbito olfatorio, que puede ser valorado de forma distinta según el

genotipo del animal. Es interesante señalar que el sistema olfativo, especialmente enriquecido de terminales colinérgicas, está afectado en los pacientes con la enfermedad de Alzheimer, con una dificultad para identificar los estímulos olfativos que ha sido reproducida también en modelos animales (Djordjevic *et al.*, 2008). Por tanto, al repetir el test, se pierde el elemento 'neo' contextual visual y olfativo aportado por la caja y el propio procedimiento lo que justificaría que los ratones NTg muestren menos interés por investigar el ambiente. En el caso de los ratones 3xTg-AD el nivel de neofobia inicial se mantiene tras la repetición del test, probablemente ayudado por la falta de reconocimiento del estímulo olfatorio y su alteración cognitiva y emocional creciente que genera miedo en un lugar que debería resultar familiar. Gracias a esta particularidad, el test de neofobia puede ser utilizado para el seguimiento conductual de los animales a lo largo de un estudio longitudinal. De hecho así lo hicimos a lo largo del estudio.

Test de campo abierto

La prueba del campo abierto evalúa conductas emocionales y no emocionales, y es probablemente el test más utilizado en la caracterización de los perfiles conductuales de los roedores desde que Calvin Hall desarrolló el test en los años 30. En nuestras baterías, el campo abierto se administra inmediatamente después del test de las esquinas, aprovechando que el animal tiene que ser trasladado a la sala experimental dentro de una caja cuadra nueva (la que ha servido para aquel test). Como en la valoración de la neofobia previo, los ratones 3xTg-AD presentaban también una disminución significativa de la 'actividad vertical y horizontal'. Estas alteraciones conductuales pueden deberse no sólo a los cambios de emotividad sino también a una pérdida de la motivación para explorar y el control inhibitorio de la conducta exploratoria espontánea que se asemejan a los síntomas descritos para la EA (Chung y Cummings, 2000). Durante el test también se observó un incremento de la presencia de orina que puede estar asociado con la ansiedad o la respuesta de miedo y que, a estas edades, puede estar favorecida por la posible aparición de

incontinencia que es característica en las fases avanzadas de la enfermedad en humano.

En la prueba del campo abierto se estudia la conducta de ‘acicalamiento’, una conducta común regulada por los ganglios basales y el hipotálamo que se observa en múltiples especies y que interactúa en la reducción del estrés, la higiene y la estimulación sensorial (Kalueff, 2007 y Kyzar, *et al.*, 2011). En los ratones 3xTg-AD se observó que la conducta de acicalamiento aparecía de forma más tardía en el tiempo con respecto a su control NTg de la misma edad. Estas diferencias pueden estar relacionadas con el incremento de ansiedad observada que impide que el animal se sienta seguro para realizar la auto-limpieza. También, los síntomas de apatía y pérdida de interés por el cuidado personal forman parte de la afectación de las actividades de la vida diaria en la EA (Cummings, 2000) pero son menos probables en este contexto experimental. En la caracterización de la interacción social en el estudio 1 ya observamos como la latencia del acicalamiento se retrasaba a la par que aumentaba el número de enterramientos, otra conducta de disipación del estrés (revisado Fernández-Teruel *et al.*, 2005). Estos resultados en machos de 12 meses de edad corroboran estudios previos en nuestras colonias de ratones 3xTg-AD (Giménez-Llort, *et al.*, 2006, 2007, 2010; García *et al.*, 2010, García-Mesa *et al.*, 2012) y de otros laboratorios (Sterniczuk *et al.*, 2010 a,b).

Ritmo circadiano

Los cambios del ritmo circadiano, relacionados con los estados de sueño y vigilia, son trastornos característicos de la EA que se presentan desde su etapa temprana y se mantienen a lo largo de la misma. Las alteraciones del sueño se observan entre el 25-35% de los pacientes y están asociadas a un deterioro funcional y cognitivo (Greenwood *et al.*, 2005 y Vecchierini, 2010). A nivel experimental nuestro laboratorio describió que el ritmo circadiano estaba alterado en machos 3xTg-AD desde los 6 meses de edad (Giménez-Llort *et al.*, 2007). Otros autores confirmaron estos hallazgos describiendo alteraciones en el patrón de la actividad y del ritmo circadiano en los ratones 3xTg-AD con un

aumento significativo, con respecto a los animales NTg, de la actividad diurna y una disminución nocturna desde mucho antes del inicio de la neuropatología A β (Sterniczuk *et al.*, 2010).

En el presente estudio, el patrón de actividad motora a lo largo de un ciclo circadiano mostró que los ratones 3xTg-AD presentaban una hipoactividad tanto horizontal como vertical durante el período de luz (fase 1) hasta el inicio del ciclo nocturno. En particular, estos animales mostraron una disminución significativa ya en el valor de partida ('cota 0') que abarca la primera media hora del test así como cuando se considera el primer bloque entero de actividad llamado 'etapa de habituación' (las 3 primera horas del test) que concuerda con el perfil ansioso e hipoactivo descrito en los animales 3xTg-AD de nuestra colonia y que va aumentando de forma progresiva con la edad (Giménez-Llort *et al.*, 2007). Los animales 3xTg-AD no mostraron diferencias en los niveles basales de actividad durante la 'etapa de actividad basal' (a partir de la tercera hasta la quinta hora del test) que evalúa el resto de las horas con luz, ni durante todo el ciclo activo de oscuridad. Anticipándose al cambio de ciclo, la actividad aumentó por igual en ambos genotipos (fase 2) y se mantuvo de forma equivalente hasta el final del período nocturno. Sin embargo, en la actividad vertical realizada durante las últimas horas del período nocturno se observó una disminución de la actividad vertical en los ratones 3xTg-AD con respecto a su control que estaría de acuerdo con los resultados del trabajo de Sterniczuk (2010). Estos resultados conductuales en los ratones 3xTg-AD emulan muy parcialmente lo que clínicamente se ha denominado '*sundowning syndrome*' (Vecchierini, 2010) con somnolencia durante el periodo 'activo' diurno y la deambulación nocturna. Probablemente, los componentes de motivación/apatía y ansiedad que caracterizan a nuestra colonia pueden estar condicionando de forma general los niveles de actividad exploratoria *per se* y solo se reproduce la hipoactividad durante el ciclo activo que en los animales se corresponde con la noche.

Desesperanza aprendida

La depresión es uno de los síntomas del espectro de las SCPD que ocasionan un deterioro de la calidad de vida de los pacientes con EA y afecta a sus cuidadores. La respuesta conductual en la prueba de natación forzada, modelo experimental para la depresión, está relacionada con la ‘desesperanza aprendida’ que, ante un evento aversivo sobre el cual no se tiene control, induce un conjunto de manifestaciones conductuales como la pérdida de la motivación para responder, una renuncia ante la posibilidad de escapar. En esta respuesta pueden interferir déficit cognitivos y trastornos emocionales como la ansiedad (revisado por Pollak *et al.*, 2010). Se puede decir que experimentalmente la prueba ‘de desesperanza aprendida’ puede ayudar a estudiar SCPD como la depresión. Los síntomas depresivos se manifiestan ya en estados iniciales de la EA e incluso antes de que las deficiencias cognitivas sean evidente lo que sugiere que puede estar ya asociada propio al declive cognitivo leve y las alteraciones en la ejecución (Visser, *et al.*, 2000 y Royall *et al.*, 2012).

Este estudio 3 es el primero en el que se caracteriza la prueba de natación forzada en ratones 3xTg-AD. Los resultados muestran un aumento de la actividad motora asociada a la conducta de nadar y, por lo tanto, una disminución en el tiempo de inmovilidad con respecto a los ratones NTg. Estas diferencias se mostraron mejor entre el minuto 2 y el minuto 6 de la prueba, que es el intervalo en el que se considera que se expresa o se mide mejor la desesperanza conductual. Sin embargo, no hay diferencias en el tiempo invertido en la conducta de ‘escape escalando o climbing’ que es la conducta que mejor indicaría la ‘voluntad o lucha’ ante la adversidad confrontada. Estos resultados pueden estar relacionados a los déficits cognitivos que presentan los ratones 3xTg-AD para aprender y/o adaptarse a situaciones que generan alto niveles de estrés (Giménez-Llort *et al.*, 2010) y que en su elección de estrategias *fight-or-flight* pueden conducir a hiperactividad locomotora en la prueba de natación forzada. Estudios con otros modelos animales como el ratón Tg2576 mostraron una disminución significativa en el tiempo inmovilidad

relacionado al incremento de la actividad motora (Gil-Bea *et al.*, 2007) tal y como se da en nuestro estudio. Sin embargo, el ratón APP^{swe}/PS1 muestra mayor tiempo de inmovilidad (Filali *et al.*, 2009). Teniendo todo esto en cuenta y el hecho de que el incremento que observamos en los ratones 3xTg-AD sea específico de la conducta natatoria pero no de la de 'climbing', los resultados sugieren que las diferencias de genotipo son debidas a la impulsividad motriz y no a un estado de desinhibición *per se*. De hecho, al analizar la conducta en base a otros parámetros como el número de episodios, se observa que los 3xTg-AD presentan un patrón de conducta distinto, con una reducción general en el número de episodios conductuales, en inmovilidad y natación, lo que acentúa el incremento de la actividad natatoria respecto a las otras dos variables.

Conducta social

La caracterización de la conducta social en ratones 3xTg-AD en edades avanzadas es de gran importancia debido que es uno de los síntomas de la EA que se agravan con el avance de la edad (Panza *et al.*, 2011 y Andrew *et al.*, 2008). En el estudio 1 hemos caracterizado por primera vez la conducta social en ratones 3xTg-AD y nos ha permitido seleccionar los tests y variables más sensibles para ser aplicadas en una batería conductual como la que ahora aplicamos en el estudio 3. De hecho, de todas pruebas utilizadas, la interacción social fue la que se seleccionó para evaluar la conducta social y los resultados obtenidos en aquel estudio se replican de forma muy consistente en éste. Así, observamos nuevamente un deterioro en la interacción social con disminución de los 'contactos cara/cuerpo' y 'ano-genital' así como un aumento de la conducta 'cola vibrante'. Estos cambios se produjeron tanto en la 'latencia' de aparición como en el 'número de episodios' con respecto a su grupo control, poniendo de manifiesto un aumento de la ansiedad y/o el hecho de que el grupo de ratones NTg estuviese más motivado o dispuesto en explorar al otro ratón. En relación a esta interpretación, también se observó en las conductas no-

sociales una disminución de la actividad exploratoria vertical 'levantamiento' y horizontal 'número de esquinas' tal y como ocurrió en el estudio 1.

Laberinto en T

Con el fin de evaluar la memoria de trabajo y la alternancia espontánea se utilizó el laberinto en T que se basa en la tendencia espontánea de los ratones para explorar los lugares, especialmente los no conocidos. No se observaron diferencias significativas entre los ratones 3xTg-AD y su grupo control en el número de errores cometidos durante la prueba ni en las otras variables estudiadas, con la excepción de una mayor incidencia de orina en la semana 5. A pesar de esto, los resultados del tiempo total en completar la prueba indicaron una tendencia en los ratones 3xTg-AD a emplear mayor tiempo con respecto a su grupo control congruente con la predisposición a reducir la conducta exploratoria horizontal tal como se ha descrito en otras pruebas como el campo abierto en éste y los otros trabajos previos (Giménez-Llort, *et al.*, 2007). Además, varios estudios con ratones transgénicos han reportado disminuciones en la alternancia espontánea en el laberinto en Y (Lalonde, *et al.*, 2003a) y en el laberinto en T (Giménez-Llort *et al.*, 2010) desde los 6 meses de edad indicando una pérdida de la motivación para explorar, similar a los síntomas de apatía descritos para la EA (Chung y Cummings, 2000).

Laberinto acuático de Morris

También para evaluar el aprendizaje y memoria en los ratones 3xTg-AD se utilizó el laberinto acuático de Morris (Morris *et al.*, 1984) donde los ratones deben aprender a localizar una plataforma sumergida que se encuentra ubicada en la misma zona durante los 5 días de duración de la prueba. En este estudio se observó que en comparación al grupo de ratones NTg, los ratones 3xTg-AD presentaron una peor curva de aprendizaje, empleando mayor tiempo para hallar la plataforma, por tanto mostrando una progresión más lenta con déficits de memoria a corto y largo plazo. Además cuando los valores de la curva llegan a la asíntota se demuestra que los ratones 3xTg-AD presentan también una

menor capacidad de aprendizaje final. En la prueba de retirada de la plataforma, que consiste en cuantificar el nivel de búsqueda en la zona donde se encontraba la plataforma, se observó que los ratones 3xTg-AD presentaron un menor número de entradas con respecto al grupo de ratones NTg, aunque la disminución en el tiempo de permanencia no llegó a ser significativa. En test, la capacidad de memoria a corto plazo está también afectada.

Test de Marble o de enterramiento de mármoles

La conducta de enterramiento es característico de los roedores y está dirigido casi siempre a diversos objetos ya sean peligrosos o nocivos y se describe como un comportamiento defensivo que refleja su capacidad de relación con el entorno (Prajapati *et al.*, 2011). La mayor parte de los autores encuentran en el test de enterramiento de mármoles una prueba conductual para valorar la efectividad de fármacos antipsicóticos (Bruins Slot. *et al.*, 2008). Este test simula también algunos aspectos del trastorno obsesivo-compulsivo, por lo que a menudo se utiliza como un modelo de cribado de la ansiedad de este tipo, orientado a la reducción de la conducta de enterramiento en los roedores (Njung'e. *et al.*, 1991 y Bruins Slot. *et al.*, 2008).

Esta es la primera vez que se caracteriza la conducta de enterramiento de mármoles en el modelo de ratón 3xTg-AD y en ella se observó como los ratones interactuaban con el mármol del test de forma significativamente distinta a como lo hacían los ratones NTg. Así, mientras que los ratones NTg presentaron un incremento de mármoles cambiados de posición, los 3xTg-AD aumentaron el número de mármoles enterrados. Estas diferencias pueden estar influenciadas también con ansiedad y la hiperactividad compensatoria asociada que les puede ocasionar el paradigma, donde la presencia de serrín facilita y/o induce la actividad de escarbar, tal como se observó en el incremento de la conducta de enterramiento en los 3xTg-AD durante la interacción social del estudio 1 y de este propio estudio.

La caracterización de esta conducta en los ratones 3xTg-AD es importante para determinar que los estos animales son un modelo animal válido para estudiar,

estereotipias relacionadas con el espectro psicótico y/o de ansiedad de tipo obsesivo compulsivo que en otros modelos animales para la EA, como los ratones Tg2576, no se presentan (Deacon, *et al.*, 2008). También para valorar en un protocolo rápido y sencillo, este tipo de conductas que tendrían que servirnos para demostrar la efectividad del tratamiento con el antipsicótico.

En realidad, las mejores variables funcionales para las alteraciones en el filtrado atencional propias de los trastornos psicóticos y la esquizofrenia son la disminución la respuesta de inhibición latente en la shuttle box y de la respuesta de inhibición por un prepulso en la startle box. Estas deficiencias han sido replicadas en modelos animales para la EA como el modelo A β PP751SL, PS1M146, A β PP/PS1 (Guart *et al.*, 2008) y los 3xTgAD (García *et al.*, 2011). Aunque estas pruebas validadas para modelar en animales estas alteraciones del rango psicótico hubiesen sido las mejores para definir el estado basal de los animales así como la efectividad de la risperidona durante el tratamiento, fueron descartadas como integrantes de la batería por la complejidad de sus paradigmas.

Glucosa plasmática y tolerancia a la glucosa

El síndrome metabólico (SM) es uno de los factores de riesgo que en la literatura clínica despierta más interés y esta caracterizado por la presencia de tres o más factores de riesgo cardiovascular como la obesidad abdominal, la hipertensión, la hiperglucemia y la dislipidemia. El síndrome se asocia con un mayor riesgo de diabetes mellitus tipo 2 y enfermedad cardiovascular, que se han relacionado con la EA así como con otras demencias como la vascular (Razay, *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2010).

La prevalencia del SM se incrementa con la edad y en muestras geriátricas alcanza una prevalencia de entre el 22,6% y el 40,0%. La relación entre la EA, la edad y el SM puede formar parte de los mecanismos fisiopatogénicos de la EA que permitirían esperar una prevalencia todavía superior en estos pacientes. Estudios clínicos retrospectivos que controlan los factores de edad, el sexo, las puntuaciones en el MMSE y en la escala de Blessed y los

antecedentes de enfermedad cardíaca, sugieren que el SM no influye en un incremento de la mortalidad en muestras clínicas de EA (Vilalta-Franch, *et al.*, 2008). A pesar de esto, los pacientes con SM son diagnosticados de EA a una edad más temprana a pesar de un menor deterioro cognitivo y funcional.

A nivel del sistema nervioso central, las personas con EA presentan reducciones en la captación de la glucosa a través de grandes áreas de la corteza (Nicholson *et al.*, 2010). Aunque la causa exacta de esta reducción no se conoce, diversas investigaciones sugieren que es parte de una compleja adaptación metabólica al estrés oxidativo (revisado por Mamelak, 2012). Estos cambios también se producen en los pacientes con deterioro cognitivo leve y el hipometabolismo de la glucosa se considera como el mejor predictor de progresión de la EA en personas cognitivamente normales (Hartl, *et al.*, 2012). Estudios con ratones 3xTg-AD han observado una disminución pronunciada y generalizada de la captación de fluorodesoxiglucosa a los 18 meses de edad en diversas áreas cerebrales (Nicholson *et al.*, 2010).

En nuestro estudio decidimos evaluar los niveles de glucosa plasmática y la tolerancia en ratones 3xTg-AD como evaluación de rigor dado el escenario a nivel clínico. Los resultados en el presente estudio indica que los ratones 3xTg-AD a los 12 meses de edad no mostraron diferencias significativas con el grupo NTg. Estos resultados concuerdan con datos publicados (Giménez-Llort., *et al.*, 2008, 2010) y experimentales previos de nuestro laboratorio en los que es al principio de la enfermedad cuando los animales presentan un deterioro de la homeostasis de la glucosa (IPGTT) y los ratones NTg les igualan con el avance de la enfermedad. Estos resultados, refuerza la hipótesis de que es probable que la presencia de β A interfiera en la homeostasis de la glucosa pero que los cambios durante el envejecimiento hagan desaparecer las diferencias de genotipo.

En su conjunto y de forma abreviada, podemos decir que la caracterización de los animales 3xTg-AD de este estudio 3 encontró alteraciones en aspectos cognitivos de aprendizaje y memoria a corto y largo plazo en el laberinto

acuático de Morris pero no en memoria de trabajo. Los cambios de tipo SCPD se observaron como incremento de la neofobia y disminución de la actividad exploratoria del animal, conductas indicadoras de emotividad y ansiedad en varios tests, deficiencias en la interacción social y la conducta de enterramiento de mármoles, mientras que el estudio del ritmo circadiano solo replicó la disminución de actividad durante el ciclo 'activo' y la prueba de desesperanza aprendida parece que estaba condicionada por la impulsividad motriz. En actividades de la vida diaria, el acicalamiento mostró un perfil alterado más propio de su rol como conducta disipadora de la ansiedad. La tolerancia a la glucosa fue normal.

Conclusiones

Las conclusiones de la *caracterización del perfil cognitivo y tipo SCPD en los ratones 3xTg-AD y NTg a los 12 meses de edad* en el estudio 3 fueron las siguientes:

1. Los ratones 3xTg-AD mostraron un incremento de neofobia en el test de las esquinas con una reducción de la actividad exploratoria horizontal y vertical. El número de 'esquinas visitadas' y el número de 'levantamientos' fueron las variables más sensibles para medir el incremento de neofobia en los 3xTg-AD. Esta neofobia fue una respuesta consistente ya que pudo volver a ser observada en test repetidos.
2. La prueba de campo abierto indicó diferencias entre el grupo 3xTg-AD y el NTg en las variables 'número total de levantamientos' y en 'distancia recorrida' observándose un aumento de la inhibición conductual. Aunque la mayor parte de las latencias de los eventos conductuales que indican ansiedad no se vieron modificadas, la conducta de 'acicalamiento' apareció de forma más tardía en los ratones 3xTg-AD. Se observó también un aumento del número de bolos fecales y orina que apoyan la existencia de

- cambios emocionales en los ratones machos 3xTg-AD a los 12 meses de edad.
3. Cuando se estudió el ritmo circadiano, los animales 3xTg-AD mostraron una mayor hipoactividad durante el período de luz y al final del ciclo nocturno, en comparación con el grupo control NTg, mientras que el resto de las horas del ciclo circadiano se observaron patrones similares en ambos grupos. En la fase de luz la hipoactividad es probable que esté más relacionada con el perfil ansioso del animal mientras que en la fase nocturna replicaría levemente la disminución de actividad observada en el *sundawning syndrome*.
 4. En el presente trabajo se caracteriza por primera vez la desesperanza conductual en ratones 3xTg-AD en la que se observó un patrón conductual distinto al del grupo NTg, en las variables ‘inmovilidad’ y ‘natación o *swimming*’, con una reducción en el ‘número total de episodios’ y aumento del ‘tiempo’ nadando. Sin embargo, no hay diferencias en la conducta propiamente considerada de ‘escape escalando o *climbing*’, resultado que resulta paradójico respecto a una hipótesis inicial de aumento de desesperanza en estos animales y los resultados podrían estar más relacionados con la impulsividad motriz.
 5. La prueba de conducta social replicó los resultados obtenidos en el estudio 1 indicando diferencias significativas entre los ratones 3xTg-AD y NTg con un aumento de la presencia y duración de la variable ‘cola vibrante’. Entre las variables no-sociales se observó una disminución del ‘número de levantamientos’ y ‘número de esquinas visitadas’ que corrobora los resultados obtenidos en el test de esquinas, el campo abierto y la del estudio 1 de esta tesis doctoral.
 6. En el laberinto en T no se observaron diferencias significativas ni en las variables de memoria de corto plazo ni en las de ansiedad entre los ratones 3xTg-AD y su grupo control NTg. No obstante, se observó una mayor ‘incidencia de orina’ en la semana 5 en los ratones 3xTg-AD con respecto a

su grupo control NTg y una tendencia a la menor 'eficiencia exploratoria', sugestivas de cambios en la emotividad.

7. En el laberinto acuático de Morris los ratones 3xTg-AD mostraron una peor curva de aprendizaje en comparación con el grupo control NTg, con una progresión más lenta y una menor capacidad de aprendizaje final. Las diferencias en el paradigma de adquisición de la posición de la plataforma fueron debidas a déficit en la memoria de largo plazo. En la prueba de retirada de la plataforma se observaron diferencias en memoria de corto plazo con una reducción significativa en el número de entradas en la zona donde previamente estaba localizada la plataforma.
8. En el presente trabajo se caracteriza por primera vez la conducta de enterramiento de mármoles en ratones 3xTg-AD y se observan diferencias significativas, respecto al grupo NTg de la misma edad, a modo de aumento del número de mármoles 'enterrados' y una disminución de los 'cambios de posición'. Estos resultados sugieren alteraciones de los SPCD en el rango del espectro psicótico y/o de la ansiedad obsesivo-compulsiva que validan este modelo para el estudio de los efectos de la risperidona en la siguiente fase del estudio.
9. En el test de tolerancia a la glucosa, los ratones 3xTg-AD mostraron los mismos valores de glucosa basal después del ayuno nocturno que de los ratones NTg. Las curvas de tolerancia a la administración intraperitoneal de la glucosa a los 12 meses de edad fueron idénticas en ambos genotipos. En su conjunto estos resultados indican que los ratones 3xTg-AD a esta edad no reproducen la hiperglucemia ni la alteración en el metabolismo de la glucosa característicos del síndrome metabólico.

Estudio 3. Vulnerabilidad inducida por el tratamiento crónico con el antipsicótico atípico risperidona en ratones 3xTg-AD y NTg

El estudio 3 tiene como principal propósito modelar en los ratones 3xTg-AD la vulnerabilidad que conlleva un incremento de la mortalidad observada en algunos pacientes con EA tras la administración crónica de antipsicóticos atípicos como la risperidona.

En la EA, los tratamientos con antipsicóticos atípicos son eficaces en el control de la ira, la agitación, la agresividad y los síntomas más propios del espectro psicótico como alucinaciones, paranoias y delirios, mientras que los síntomas cognitivos, la calidad de vida y atención no mejoran con dichos tratamientos (Kálmán, *et al.*, 2008). En la primera parte del estudio 3 la batería de pruebas conductuales nos permitió caracterizar el fenotipo de los animales y verificar la existencia de deficiencias cognitivas y de tipo SCPD entre las que destacar el incremento de la conducta estereotipada de enterramiento de mármoles, usada habitualmente para valorar la eficacia de antipsicóticos y las alteraciones de la conducta social.

En esta segunda parte del estudio 3, estudiamos primeramente la respuesta de los ratones 3xTg-AD ante el tratamiento crónico con risperidona y proseguimos con el seguimiento de las curvas de peso y la supervencia con el fin último de comprobar si podíamos validar el modelo para la vulnerabilidad observada en humanos.

Los animales que murieron antes de completar la comparación conductual fueron excluidos del análisis estadístico. La *n* final de animales usados en la valoración de los efectos conductuales del fármaco se detalla en la tabla 15.

Materiales y Métodos

Sujetos experimentales

Con la finalidad de observar cómo responden los ratones 3xTg-AD ante un tratamiento antipsicótico en un estudio longitudinal excluimos los animales que se murieron para poder realizar una comparación conductual, de manera que la n final de animales en los que se basa el estudio 4 se detalla en la siguiente tabla.

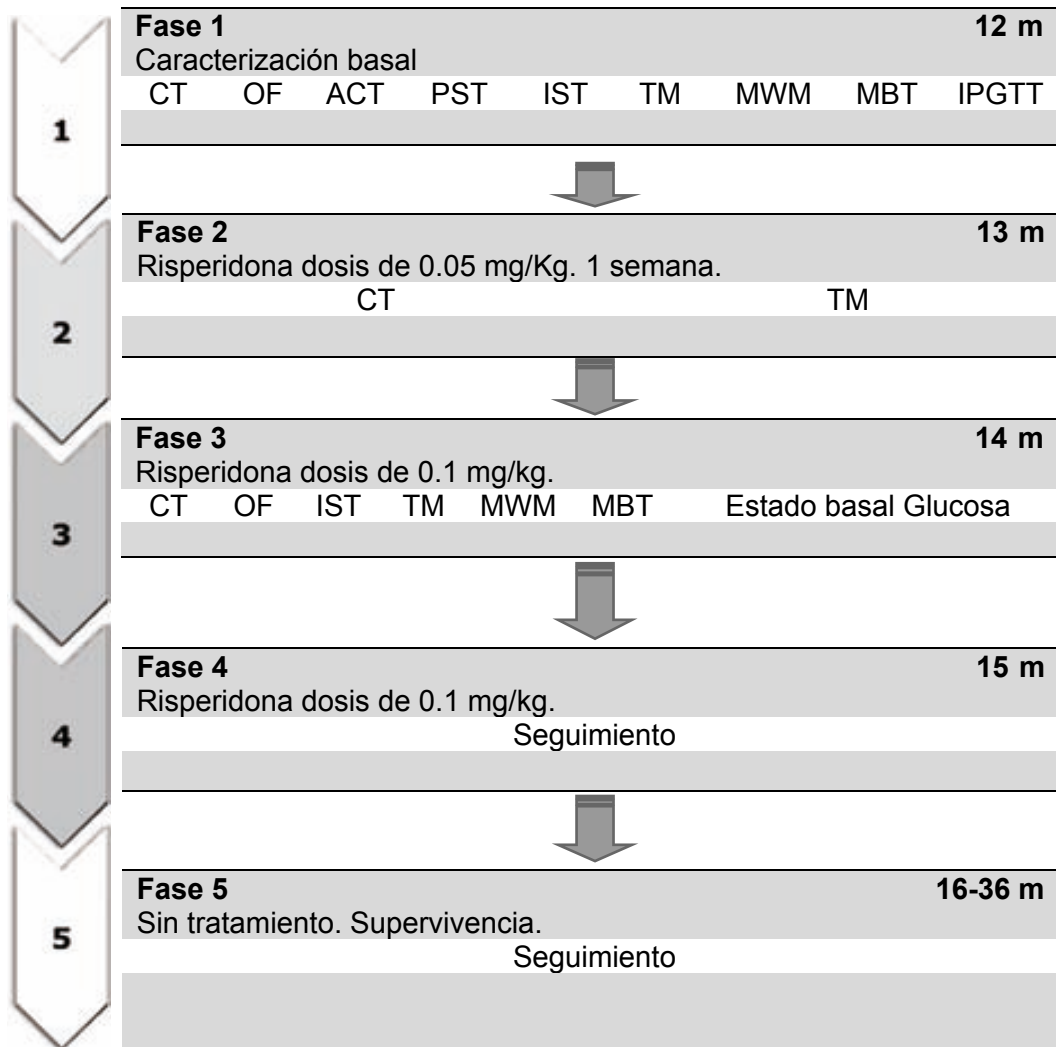
Tabla 15. Diseño experimental

Protocolos:	NTg(s)	NTg(r)	3xTg-AD(r)	3xTg-AD(r)
13 meses de edad				
<i>Fase 1 semana 7</i>	12	11	12	11
Prueba de neofobia				
Laberinto en T				
<i>Fase 2 semana 8</i>				
Prueba de neofobia				
<i>Semana 9</i>				
Prueba de neofobia				
Prueba del campo abierto				
<i>Semana 10</i>				
Prueba de neofobia				
Laberinto en T				
Estado basal de la glucosa				
<i>Semana 11</i>				
Prueba de neofobia				
Test de interacción social				
<i>Semana 12</i>				
Prueba de neofobia				
<i>Semana 13</i>				
Laberinto acuático de Morris				
<i>Semana 16</i>				
Test de enterramiento de mármoles				
Total de animales	46			

Diseño experimental

El estudio longitudinal se dividió en 5 fases: Fase 1 caracterización basal, sin fármaco, Fase 2 administración de risperidona a una dosis baja de 0.05 mg/kg durante una semana y consta con pruebas de seguimiento, Fase 3 administración de risperidona a una dosis final de 0.1 mg/kg y valoración conductual, Fase 4 continuación de la administración farmacológica y Fase 5 sin fármaco, seguimiento de las variables peso y supervivencia.

Figura 16. Diseño experimental



Tratamiento farmacológico con el antipsicótico atípico risperidona

El tratamiento con risperidona se inició con una dosis baja 0.05 mg/kg y después de 7 días se comenzó a suministrar la dosis final de 0.1 ml/kg (Bruins Slot *et al.*, 2008). Al grupo control se les suministró solución salina. La administración fue subcutánea durante 3 meses en un tratamiento crónico,

alternado la administración entre la zona del cuello y los flancos para evitar malestar en el animal.

Grupos experimentales:

1. Ratones NTg (s) = Ratones NTg administrados con solución salina.
2. Ratones NTg (r) = Ratones NTg administrados con risperidona.
3. Ratones 3xTg-AD (s) = Ratones 3xTg-AD administrados con solución salina.
4. Ratones 3xTg-AD (r) = Ratones 3xTg-AD administrado con risperidona.

Fase 1. Caracterización del perfil cognitivo y tipo SCPD en los ratones NTg y 3xTg-AD a los 12 meses de edad

En esta fase experimental se utilizaron animales de 12 meses de edad que se corresponden con la manifestación de síntomas asociados a la fases avanzadas de la enfermedad (Oddo et al., 2003). El experimento se llevó a cabo con un total de 46 ratones machos NTg y 3xTg-AD (Tabla 15).

Fase 2. Tratamiento con risperidona a una dosis de 0.05 mg/kg

En esta fase experimental se utilizaron los protocolos que valoran la capacidad exploratoria del animal y los comportamientos de ansiedad. Ésta fase tuvo una duración de 1 semana.

Los protocolos utilizados fueron:

1. Prueba de las esquinas o prueba de neofobia.
2. Laberinto en T.

Fase 3. Evaluación de los efectos a largo plazo del tratamiento en las variables vitales y pruebas conductuales en los ratones 3xTg-AD y NTg. Tratamiento con risperidona a una dosis de 0.1 mg/kg

En esta fase se incluyen diferentes protocolos que valoran los comportamientos de ansiedad, la interacción social, la conducta de enterramiento, el aprendizaje y memoria. A nivel fisiológico se midieron los niveles basales de la glucosa. Esta fase tuvo una duración de 8 semanas.

A continuación se detallan los protocolos utilizados:

1. Prueba de las esquinas o neofobia.
2. Prueba del campo abierto.
3. Test de interacción social.
4. Laberinto en T.
5. Laberinto acuático de Morris.
6. Test de enterramiento de mármoles.
7. Estado basal de la glucosa.

Todas estas pruebas fueron explicadas en la página 100 del Estudio 3. Las pruebas como actimetría de 24h, natación forzada y test de tolerancia a la glucosa intraperitoneal no se aplicaron debido a la edad avanzada de los animales y para evitar una muerte experimental previa.

Fase 4. Seguimiento del tratamiento con risperidona en los grupos de ratones 3xTg-AD y NTg a una dosis de 0.1 mg/kg.

En la fase 4, se siguió el tratamiento con el fármaco, sin aplicar ninguna prueba conductual.

Fase 5. Seguimiento de las variables vitales desde el inicio del proceso experimental hasta el final de la vida de los ratones 3xTg-AD y NTg

Durante todo el proceso experimental se llevó un control del peso y de la supervivencia como variables vitales. La evaluación de estas variables fue continua hasta el final de la vida de los animales.

Curvas de peso

La curva de peso de los animales se estableció con los datos recopilados mensualmente.

Curva de supervivencia

Las curvas de supervivencia se obtuvieron con el porcentaje de animales que se mantuvieron durante todo el procedimiento experimental.

Análisis estadístico

Los resultados se expresan como promedios \pm error estándar de la media (SEM) y porcentajes. Se realizó el análisis estadístico con el software SPSS® versión 15.0; <http://www.spss.com>, Chicago, EEUU.

Para evaluar el efecto de los factores 'genotipo', 'tratamiento' y su interacción, se utilizó el modelo lineal general multivariante 2x2 seguidos de un análisis de varianza ANOVA y un post-hoc Tukey B Test. Las comparaciones para muestras relacionadas entre dos test se efectuaron con la *t*-test para datos pareados. Para el análisis de la curva de supervivencia se utilizó el test de Kaplan-Meier. Las correlaciones entre supervivencia y las distintas variables estudiadas se evaluaron con la correlación de Pearson. En todas las pruebas, $P < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo.

Resultados

Fase 2. Tratamiento con risperidona a una dosis de 0.05 mg/Kg

La Fase 2 consistió en la administración de risperidona a una dosis baja de 0.05 mg/Kg a un grupo de ratones NTg y 3xTg-AD. A otro grupo de ratones se les administró solución salina.

Prueba de las esquinas o neofobia (CT)

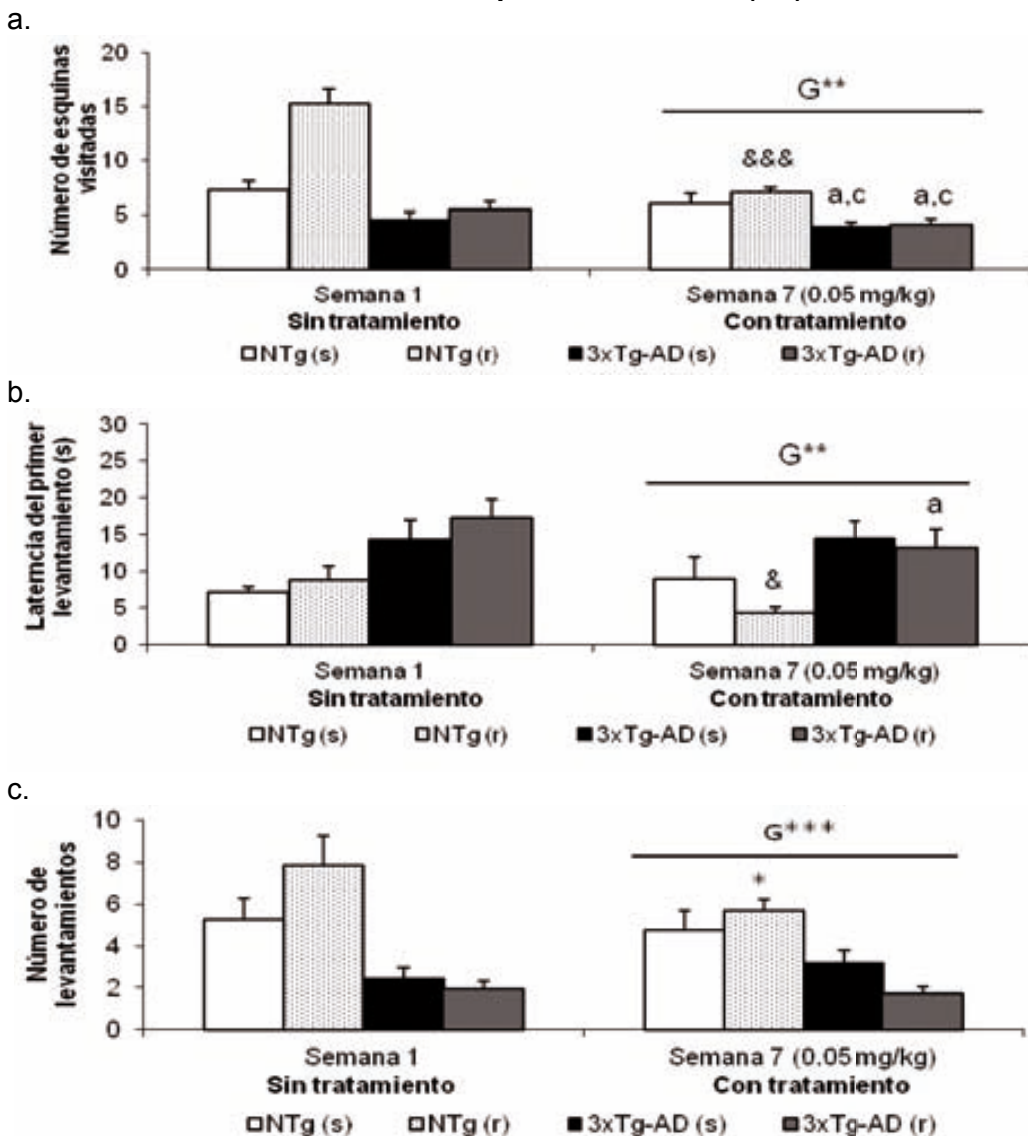


Figura 17. Prueba de neofobia durante la fase sin tratamiento y con tratamiento. (a) número total de esquinas visitadas, (b) latencia del primer levantamiento(s) y número total de levantamientos (s). ANOVA 2x2, efecto genotipo (G) ** $P < 0.05$ y *** $P < 0.001$. Post-hoc Tukey B test * $P < 0.05$. vs. todos los otros grupos experimentales; ^a $P < 0.05$ vs. distinto genotipo pero el mismo tratamiento y ^c $P < 0.05$ vs. distinto genotipo y distinto tratamiento. *t*-test para datos pareados, efecto tratamiento: tratamiento con una dosis de 0.05 mg/kg vs sin tratamiento, & $P < 0.05$ y &&& $P < 0.001$.

La Figura 17 ilustra los resultados del tratamiento en el estudio longitudinal, es decir, obtenidos en la valoración conductual realizada durante la fase sin tratamiento y en la realizada con tratamiento.

Realizando una prueba t para datos pareados se encontró que solo habían cambios significativos entre una y otra fase en los ratones NTg que recibieron risperidona [NTg (r)] donde se observó una disminución de la actividad exploratoria horizontal en la variable 'número de esquinas visitadas' [$t= 6.259$, gl 10, $P < 0.001$] y la 'latencia de levantamiento' se adelantaba en el tiempo [$t= 2.516$, gl 10, $P < 0.05$]. En la variable 'número de levantamiento' no se observaron diferencias significativas (Figura 17).

Cuando se comparan los cuatro grupos entre sí, en la variable 'número de esquinas visitadas' el modelo lineal multivariante indicó efecto de genotipo [$F_{(1,43)}=12.567$, $P < 0.01$] fue debido a una disminución de casi la mitad en los grupos de ratones 3xTg-AD respecto a los otros grupos NTg.

En la 'latencia del primer levantamiento' el efecto de genotipo [$F_{(1,43)}=9.293$, $P < 0.01$] se obtuvo por un incremento de la latencia en los grupos de ratones 3xTg-AD con respecto a los otros dos grupos NTg.

En la variable 'número de levantamientos' el efecto de genotipo [$F_{(1,43)}=17.690$, $P < 0.001$] fue debido a una disminución en los grupos de ratones 3xTg-AD respecto a los otros dos grupos NTg.

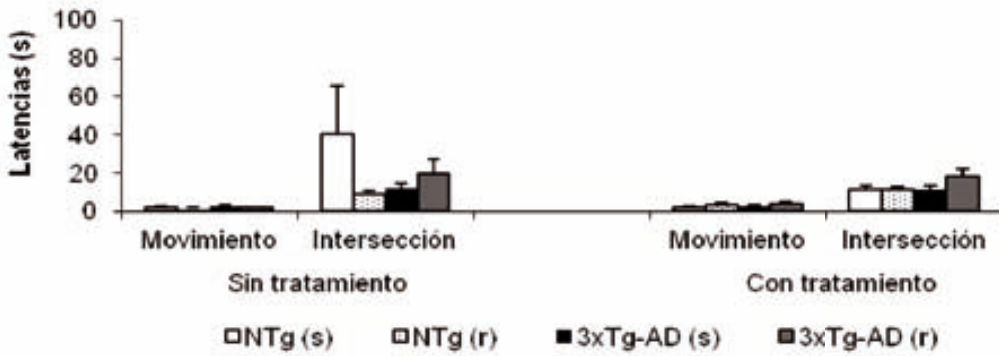
Tabla 16. Prueba de las esquinas y Laberinto en T

	GENOTIPO NTg(s)=12, NTg(r)=11, 3xTg-AD(s)=12, 3xTg-AD(r)=11	TRATAMIENTO	GENOTIPO X TRATAMIENTO	POST-HOC TUKEY B TEST Ver Figura 17
PESOS				
Peso (gr.) (Semana 8)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
PRUEBA DE LAS ESQUINAS				
Número de esquinas visitadas	$F_{(1,43)}=12.567^{**}$	n.s.	n.s.	**; $3xTg-AD(s,r) \neq NTg(s,r)$
Latencia del primer levantamiento (s)	$F_{(1,43)}=9.293^{**}$	n.s.	n.s.	**; $3xTg-AD(r) \neq NTg(r)$
Número de levantamientos	$F_{(1,43)}=17.690^{***}$	n.s.	n.s.	*; $NTg(r) \neq NTg(s)$, $3xTg-AD(s,r)$ Ver Figura 18
PRUEBA DEL LABERINTO EN T				
<i>Actividad exploratoria horizontal</i>				
Latencia de movimiento (s)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Latencia en cruzar la intersección del laberinto (s)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Actividad exploratoria (s)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Eficiencia exploratoria en completar el laberinto (s)	n.s.	$F_{(1,43)}=4.166^*$	n.s.	n.s.
Número de errores	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Presencia de defecación y orina				
Número total de bolos fecales	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Número total de orina	$F_{(1,43)}=4.315^*$	n.s.	n.s.	n.s.
Modelo lineal general multivariante, ANOVA y Post-hoc Tukey B Test; *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$ y * $P < 0.05$.				

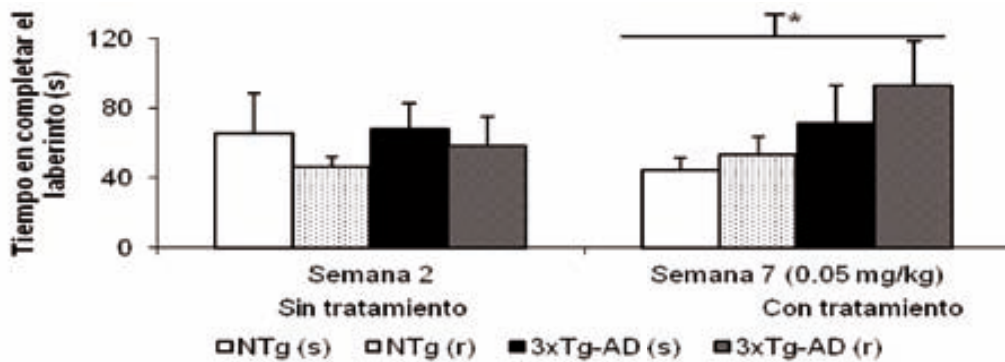
Laberinto en T (TM)

Con la finalidad de evaluar la memoria de trabajo y la actividad exploratoria se realizó la prueba de alternancia espontánea en el laberinto en T. Los resultados se ilustran en la Figura 18 y la Tabla 16.

a.



b.



c.

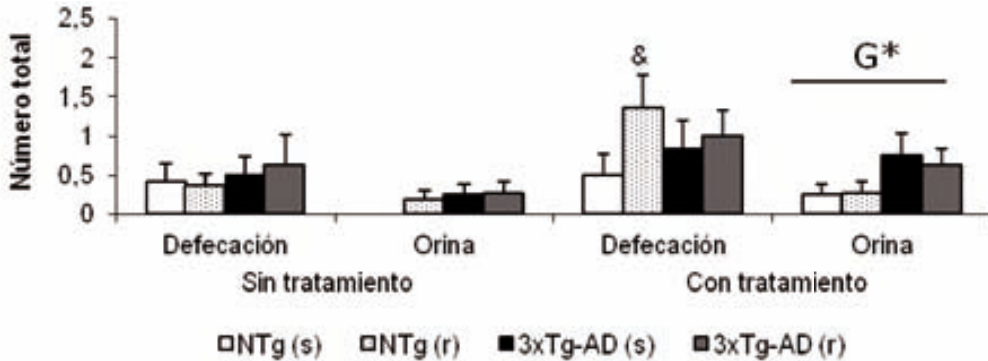


Figura 18. Prueba de laberinto en T durante la fase sin tratamiento y con tratamiento. (a) latencias (s), (b) tiempo en completar el laberinto (s) y (c) número total de defecaciones y orina. ANOVA 2x2, efecto genotipo (G), tratamiento (T), * $P < 0.05$. t -test para datos pareados, efecto tratamiento: tratamiento con una dosis de 0.05 mg/kg vs sin tratamiento, & $P < 0.05$.

La Figura 18 detalla los resultados del tratamiento en el estudio longitudinal, es decir, obtenidos en la valoración conductual realizada durante la fase sin tratamiento y en la realizada con tratamiento.

Cuando se realizó una prueba t para datos pareados ésta indicó diferencias solo en el caso de los ratones NTg (r) y para la variable bolos fecales [$t = -2.803$, $gl = 11$, $P < 0.05$] donde se observó un incremento con respecto a la fase sin tratamiento.

Cuando se comparan los cuatro grupos entre sí, en la variable 'tiempo en completar el laberinto' el modelo lineal multivariante mostró efecto tratamiento [$F_{(1,43)} = 4.166$, $P < 0.05$] y no se observó efecto genotipo ni interacción entre ambos factores.

En la variable 'número total de orina' se observó un efecto de genotipo [$F_{(1,43)} = 4.315$, $P < 0.05$] debido a un incremento de la presencia de orina en los ratones 3xTg-AD con respecto a los dos grupos NTg. (Figura 18c).

Fase 3. Evaluación de los efectos a largo plazo del tratamiento en variables vitales y pruebas conductuales en los ratones 3xTg-AD y NTg

En la fase 3, la dosis de 0.05 ml/kg de risperidona fue reemplazada por la dosis final de 0.1 ml/kg que fue administrada durante 3 meses (Bruins Slot, et al., 2008).

En esta fase se incluyen diferentes pruebas que valoran los comportamientos de ansiedad, la interacción social, la conducta de enterramiento así como el aprendizaje y memoria. A nivel fisiológico se midió el estado basal de la glucosa sin ayuno. La valoración conductual se realizó a lo largo de 8 semanas. Adicionalmente, se llevó un control del peso y la supervivencia como variables vitales.

Prueba de las esquinas o neofobia (CT)

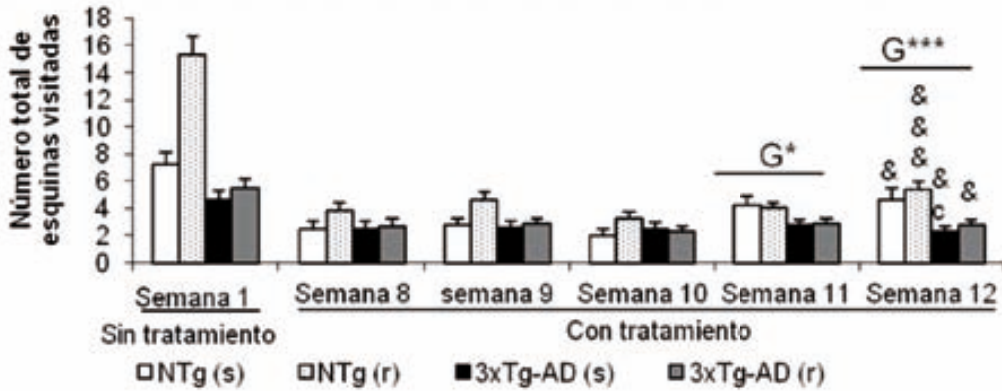
Como se detalla en la Tabla 17, el modelo lineal general multivariante, seguido de un análisis de varianza ANOVA y la comparación post-hoc Tukey B, indicó que los tres componentes conductuales que se distinguen: 'número de esquinas visitadas', 'latencia del primer levantamiento' y 'número de levantamiento' presentaron diferencias significativas en función del genotipo y tratamiento.

Tabla 17. Prueba de las esquinas

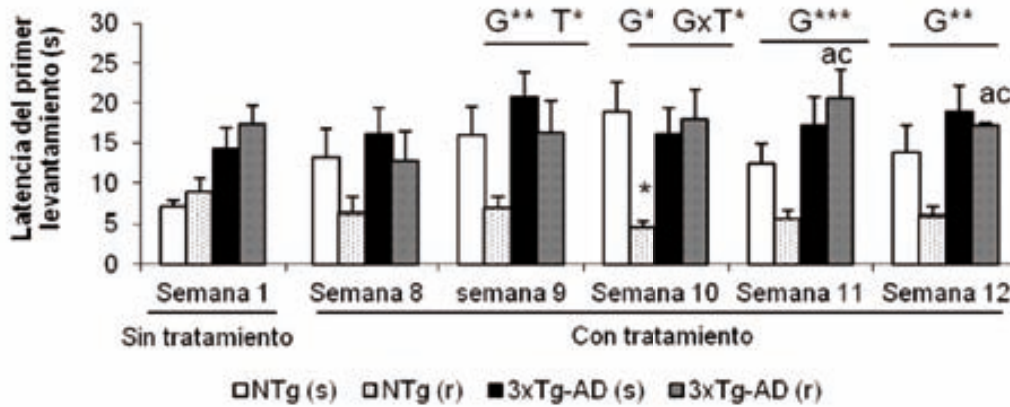
GENOTIPO	TRATAMIENTO	GENOTIPO X TRATAMIENTO	POST-HOC TUKEY B TEST
NTg(s)=12, NTg(r)=11, 3xTg-AD(s)=12, 3xTg-AD(r)=11 Ver Figura 19			
PRUEBA DE LAS ESQUINAS			
<i>Número de esquinas visitadas</i>			
Semana 8	n.s.	n.s.	
Semana 9	n.s.	n.s.	*
Semana 10	n.s.	n.s.	
Semana 11	$F_{(1,43)}=6.623^*$	n.s.	
Semana 12	$F_{(1,43)}=15.503^{***}$	n.s.	**; 3xTg-AD(s)≠NTg(r)
<i>Latencia del primer levantamiento (s)</i>			
Semana 8	n.s.	n.s.	
Semana 9	$F_{(1,43)}=7.555^{**}$	$F_{(1,43)}=4.495^*$; 3xTg-AD(s)≠NTg(r)
Semana 10	$F_{(1,43)}=4.515^*$	n.s.	**; NTg(r)≠NTg(s), 3xTg-AD(s,r)
Semana 11	$F_{(1,43)}=14.450^{***}$	n.s.	**; 3xTg-AD(s,r)≠NTg(r)
Semana 12	$F_{(1,43)}=8.128^{**}$	n.s.	; 3xTg-AD(s,r)≠ NTg(r)
<i>Número de levantamientos</i>			
Semana 8	$F_{(1,43)}=12.759^{**}$	n.s.	; 3xTg-AD(s,r) ≠NTg(r)
Semana 9	$F_{(1,43)}=9.381^{**}$	n.s.	**; 3xTg-AD(s,r)≠NTg(r)
Semana 10	$F_{(1,43)}=7.429^{**}$	$F_{(1,43)}=5.975^*$	**; NTg(r)≠NTg(s), 3xTg-AD(s,r)
Semana 11	$F_{(1,43)}=12.888^{**}$	n.s.	**; 3xTg-AD(s,r)≠NTg(s)
Semana 12	$F_{(1,43)}=25.961^{***}$	n.s.	***; 3xTg-AD(r)≠NTg(s,r)
Modelo lineal general multivariante, ANOVA y Post-hoc Tukey B Test; *** $P<0.001$, ** $P<0.01$ y * $P<0.05$.			

Prueba de las esquinas o neofobia

a.



b.



c.

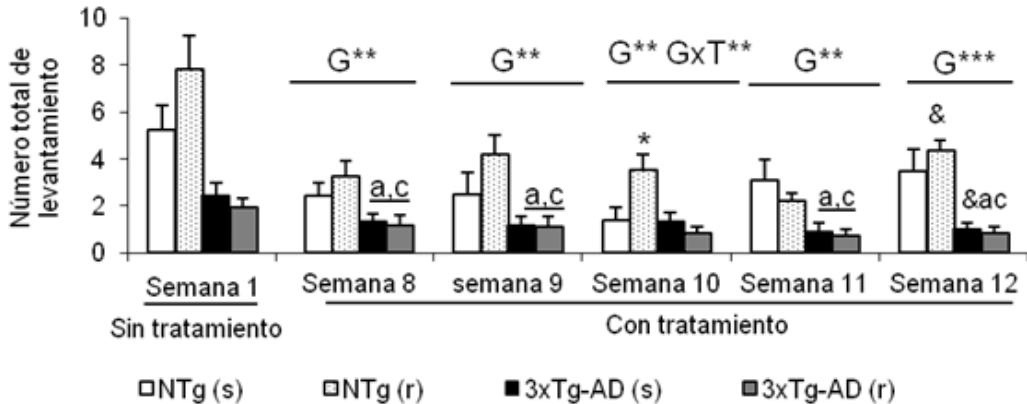


Figura 19. Prueba de las esquinas durante la fase sin tratamiento y con tratamiento. (a) número de esquinas, (b) latencias del 1^{er} levantamiento (s) y (c) número de levantamientos. ANOVA 2x2, efecto genotipo (G), interacción genotipo x tratamiento (GxT), *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$ y * $P < 0.05$. Post-hoc Tukey B test * $P < 0.05$. vs. todos los otros grupos experimentales; ^a $P < 0.05$ vs. distinto genotipo pero el mismo tratamiento; y ^c $P < 0.05$ vs. distinto genotipo y distinto tratamiento. *t*-test para datos pareados, efecto tratamiento: tratamiento con una dosis de 0.1 mg/kg vs sin tratamiento, &&& $P < 0.001$ y & $P < 0.05$.

La Figura 19 ilustra los resultados del tratamiento en el estudio longitudinal, es decir, obtenidos en la valoración conductual realizada durante la fase sin tratamiento y en la realizada con tratamiento.

Cuando se realizó una prueba t para datos pareados ésta indicó cambios significativos en la variable 'número de esquinas visitadas' donde se observó una disminución de episodios con respecto a la semana 1 en los ratones NTg (s) [$t= 3.015$, gl 11, $P<0.05$], en los ratones NTg (r) [$t= 8.517$, gl 10, $P<0.001$], en los ratones 3xTg-AD (s) [$t= 2.620$, gl 11, $P <0.05$] y en los ratones 3xTg-AD (r) [$t= 2.776$, gl 10, $P <0.05$]. Asimismo, se observó una disminución de la actividad vertical en los ratones NTg (r) [$t= 2.637$, gl 10, $P <0.05$] y en los ratones 3xTg-AD (s) [$t= 2.327$, gl 11, $P <0.05$] con respecto a la fase 1 sin tratamiento.

Cuando se comparan los cuatro grupos entre sí, en la variable 'número de esquinas visitadas' el modelo lineal multivariante mostró efecto genotipo en la semana 11 [$F_{(1,43)}=6.623$, $P < 0.05$], como en la semana 12 [$F_{(1,43)}=15.503$, $P < 0.001$] y no se observó efecto tratamiento ni interacción entre ambos factores. El efecto genotipo fue debido a una disminución de la actividad exploratoria horizontal de los grupos de ratones 3xTg-AD con respecto a los dos grupos NTg (Figura 19a).

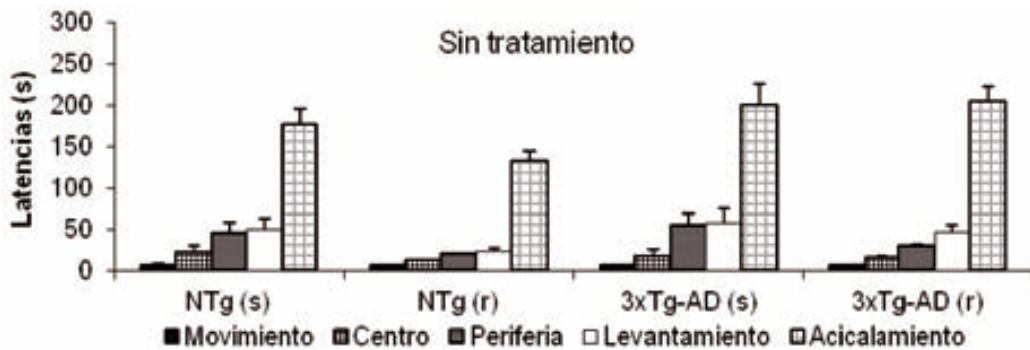
En la variable 'latencia del primer levantamiento' indicó también efecto genotipo desde la semana 9 hasta 12 [todas las $F_{(1,43)} < 14.450$, $P < 0.001$], mostró además un efecto de tratamiento en la semana 9 [$F_{(1,43)}=4.495$, $P < 0.05$ e interacción 'genotipo x tratamiento' en la semana 10 [$F_{(1,43)}=7.151$, $P < 0.05$] (Figura 19b). En la variable 'número de levantamientos' se observó efecto de genotipo desde la semana 8 hasta la 12, con todas las [$F_{(1,43)} < 25.961$, $P < 0.001$] y efecto interacción genotipo x tratamiento en la semana 10 [$F_{(1,43)}=5.975$, $P < 0.05$] (Figura 19c).

Prueba del campo abierto (OF)

El modelo lineal general multivariante, seguido de un análisis de varianza ANOVA y la comparación post-hoc Tukey B indicó que los tres componentes conductuales que se evalúan: ‘actividad exploratoria horizontal’, ‘actividad exploratoria vertical’, ‘comportamiento de acicalamiento’ y ‘presencia de defecación y orina’ presentaban diferencias significativas en función del genotipo y tratamiento como se detalla en la Figura 20 y Tabla 18.

Prueba del campo abierto

a.



b.

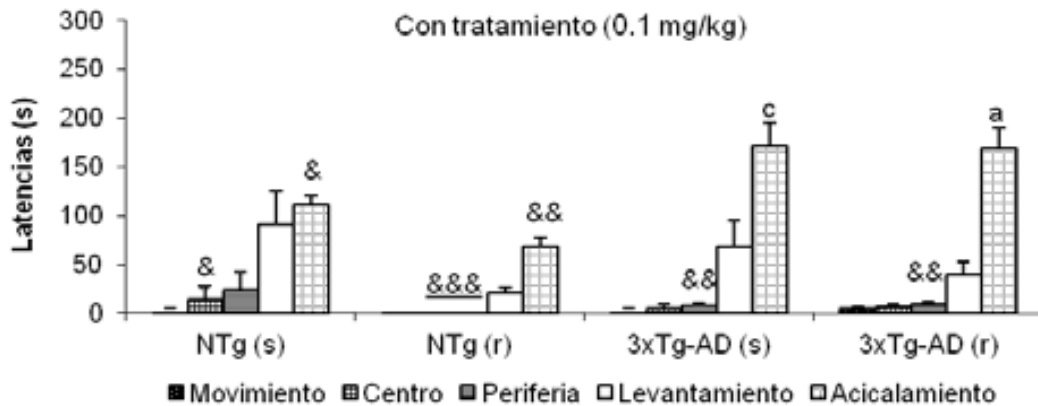
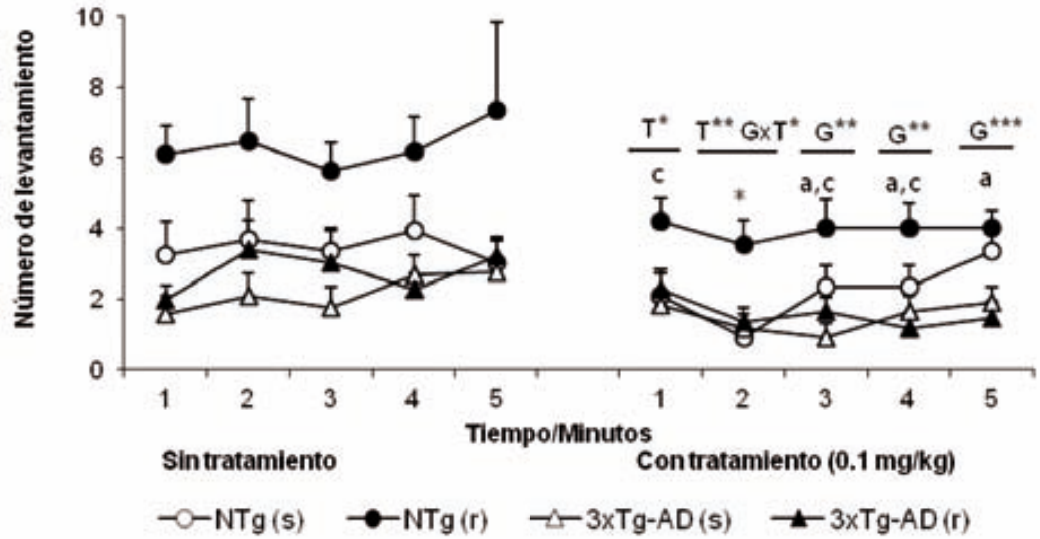


Figura 20 a.b. Prueba del campo abierto. Latencias: (a) sin tratamiento y (b) con tratamiento. Post-hoc Tukey B test ^a $P < 0.05$ vs. distinto genotipo pero el mismo tratamiento y ^c $P < 0.05$ vs. distinto genotipo y distinto tratamiento. Efecto *t*-test para datos pareados, efecto tratamiento: tratamiento con una dosis de 0.1 mg/kg (Fig.21.b) vs sin tratamiento (Fig.21.a), ^{&&&} $P < 0.001$, ^{&&} $P < 0.01$ y [&] $P < 0.05$.

c.



d.

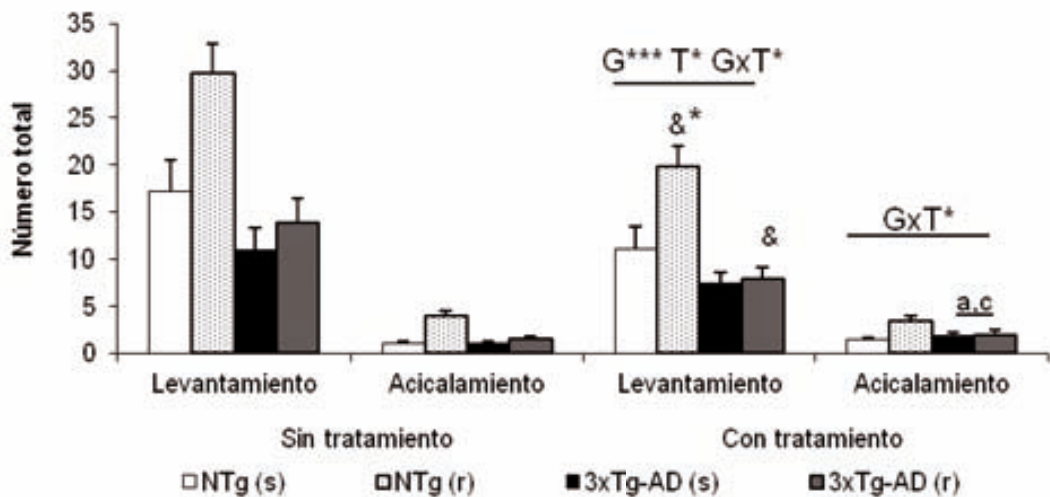
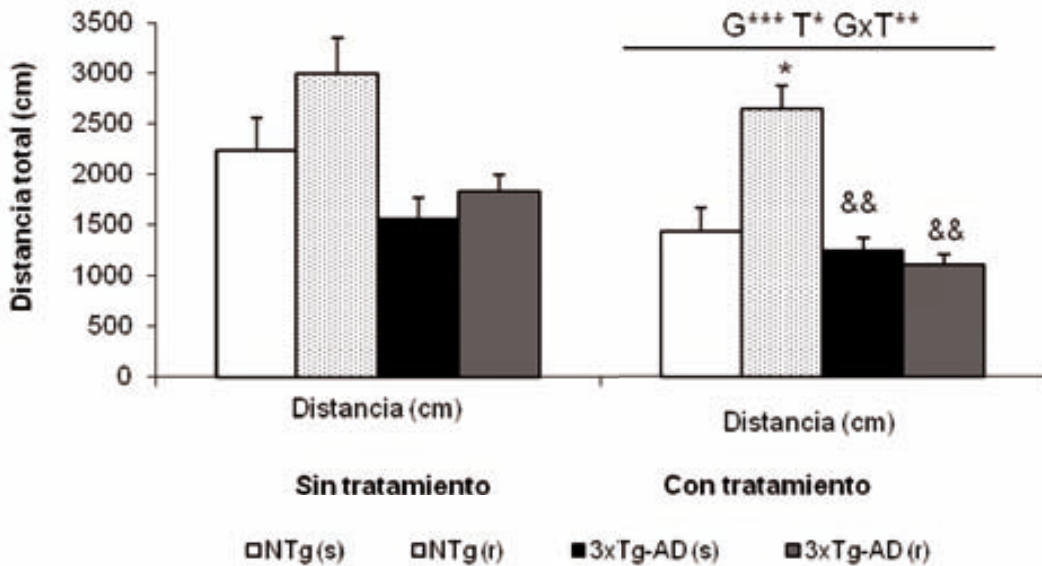


Figura 20 c.d. Prueba del campo abierto durante la fase sin tratamiento y con tratamiento. (c) número de levantamientos y (d) número total. ANOVA 2x2, efecto genotipo (G), efecto tratamiento (T) e interacción genotipo x tratamiento (GxT), *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$ y * $P < 0.05$. Post-hoc Tukey B test * $P < 0.05$. vs. todos los otros grupos experimentales; ^a $P < 0.05$ vs. distinto genotipo pero el mismo tratamiento y ^c $P < 0.05$ vs. distinto genotipo y distinto tratamiento. Efecto *t*-test para datos pareados, efecto tratamiento: tratamiento con una dosis de 0.1 mg/kg vs sin tratamiento, & $P < 0.05$.

e.



f.

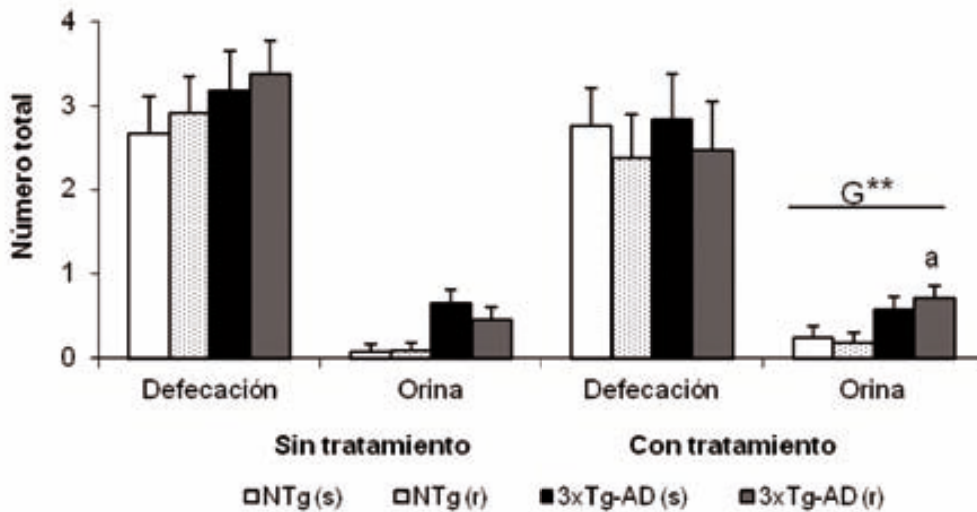


Figura 20 e.f. Prueba del campo abierto durante la fase sin tratamiento y con tratamiento. (e) distancia total (cm) y (f) número total de defecaciones y orina. ANOVA 2x2, efecto genotipo (G), interacción genotipo x tratamiento (GxT), *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$ y * $P < 0.05$. Post-hoc Tukey B test * $P < 0.05$. vs. todos los otros grupos experimentales y ^a $P < 0.05$ vs. distinto genotipo pero el mismo tratamiento. Efecto *t*-test para datos pareados, efecto tratamiento: tratamiento con una dosis de 0.1 mg/kg vs sin tratamiento, && $P < 0.01$.

Tabla 18. Prueba del campo abierto

	GENOTIPO NTg(s)=12, NTg(r)=11, 3xTg-AD(s)=12, 3xTg-AD(r)=11	TRATAMIENTO	GENOTIPO X TRATAMIENTO	POST-HOC TUKEY B TEST Ver Figura 20
PRUEBA DEL CAMPO ABIERTO				
<i>Actividad exploratoria horizontal</i>				
Latencia del primer movimiento (s)	n.s.	n.s.	n.s.	
Latencia de abandonar el punto de salida (s)	n.s.	n.s.	n.s.	
Latencia en entrar en Periferia (s)	n.s.	n.s.	n.s.	
Distancia total recorrida (cm)	$F_{(1,43)}=20.950^{***}$	$F_{(1,43)}=6.802^*$	$F_{(1,43)}=13.161^{**}$	***; NTg(r)≠NTg(s), 3xTg-AD(s,r)
Distancia total/número de levantamiento	n.s.	n.s.	n.s.	
<i>Actividad exploratoria vertical</i>				
Latencia del primer levantamiento (s)	n.s.	$F_{(1,43)}=4.376^*$	n.s.	
Levantamiento: 1 ^{er} minuto	n.s.	$F_{(1,43)}=4.471^*$	n.s.	•; NTg(r)≠ 3xTg-AD(s)
Levantamiento: 2 ^{do} minuto	n.s.	$F_{(1,43)}=7.285^{**}$	$F_{(1,43)}=6.001^*$	•; NTg(r)≠NTg(s), 3xTg-AD(s,r)
Levantamiento: 3 ^{er} minuto	$F_{(1,43)}=9.746^{**}$	n.s.	n.s.	•; NTg(r)≠ 3xTg-AD(s,r)
Levantamiento: 4 ^{to} minuto	$F_{(1,43)}=10.515^{**}$	n.s.	n.s.	•; NTg(r)≠ 3xTg-AD(s,r)
Levantamiento: 5 ^{to} minuto	$F_{(1,43)}=18.643^{***}$	n.s.	n.s.	••; 3xTg-AD(r)≠NTg(r)
Número total de levantamiento	$F_{(1,43)}=16.431^{***}$	$F_{(1,43)}=5.594^*$	$F_{(1,43)}=4.410^*$	•••; NTg(r)≠NTg(s), 3xTg-AD(s,r)
<i>Comportamiento de Acicalamiento</i>				
Latencia de acicalamiento (s)	$F_{(1,43)}=26.950^{***}$	n.s.	n.s.	•••; NTg(r)≠ 3xTg-AD(s,r)
Número total de acicalamiento	n.s.	n.s.	$F_{(1,43)}=8.718^{**}$	•; NTg(r)≠ NTg(s)
<i>Presencia de defecación y orina</i>				
Número total de bolos fecales	n.s.	n.s.	n.s.	
Número total de orina	$F_{(1,43)}=11.133^{**}$	n.s.	n.s.	•; 3xTg-AD(r)≠NTg(r)

Modelo lineal general multivariante, ANOVA y Post-hoc Tukey B test; *** $P<0.001$, ** $P<0.01$ y * $P<0.05$.

La Figura 20 ilustra los resultados del tratamiento en el estudio longitudinal, es decir, obtenidos en la valoración conductual realizada durante la fase sin tratamiento y en la realizada con tratamiento. Los datos obtenidos por cada grupo en ambas fases se analizaron mediante una prueba t para datos pareados.

En los ratones NTg tratados con salino, el análisis estadístico indicó que existían diferencias en la variable 'latencia del primer movimiento' [$t= 2.353$, gl 11, $P < 0.05$] y 'latencia de acicalamiento' [$t= 2.935$, gl 11, $P < 0.05$] mostrando un retraso en el tiempo en ambas variables. Además, se observó una disminución de la 'distancia total recorrida' [$t= 4.674$, gl 11, $P < 0.01$] con respecto a la fase sin tratamiento (Figura 20a y 20b).

En el grupo de animales NTg que recibieron risperidona se observó que las latencias de: 'primer movimiento', 'abandonar el punto de salida', 'entrar en la periferia' [todas las $t_{(10)} < 14.317$, $P < 0.001$] y 'acicalamiento' [$t= 3.681$, gl 10, $P < 0.01$] se adelantaban en el tiempo respecto a los valores obtenidos en la fase sin tratamiento. Referente a la actividad exploratoria vertical se presentó una disminución en el 'número total de levantamiento' [$t= 2.948$, gl 10, $P < 0.05$] con respecto a la fase sin tratamiento (Figura 20b).

En los ratones 3xTg-AD tratados con salino se observó que la 'latencia de entrar en la periferia' [$t= 3.236$, gl 11, $P < 0.01$] se adelantaba en el tiempo, esto también se evidenció en el grupo de ratones 3xTg-AD tratados con risperidona [$t= 4.071$, gl 10, $P < 0.01$]. Asimismo, los ratones 3xTg-AD (r) mostraron una disminución de la actividad horizontal 'distancia recorrida' [$t= 4.104$, gl 10, $P < 0.01$] (Figura 20e) y en la actividad vertical 'número total de levantamientos' [$t= 2.512$, gl 10, $P < 0.05$] indicando diferencias entre la fase sin tratamiento y la fase con tratamiento a una dosis de 0.1 mg/kg (Figura 20d).

Cuando se comparó los cuatro grupos de animales entre sí, con el modelo lineal multivariante, se detectó un efecto genotipo en la variable 'distancia total recorrida' [$F_{(1,43)}=20.950$, $P < 0.001$], efecto tratamiento [$F_{(1,43)}=6.802$, $P < 0.05$] y efecto de interacción 'genotipo x tratamiento' [$F_{(1,43)}=13.161$, $P < 0.01$]. Esto es debido que los ratones NTg (r) realizaban mayor actividad exploratoria horizontal con respecto al grupo de ratones NTg (s) mientras que los ratones 3xTg-AD (r) realizaron menor actividad horizontal con respecto a los ratones 3xTg-AD (s) (Figura 20e).

Además, en las variables de actividad vertical se observó que la 'latencia del primer levantamiento' aunque no indicó efecto de genotipo pero mostró efecto de tratamiento [$F_{(1,43)}=4.376$, $P < 0.05$]. Del mismo modo, el 'número total de levantamientos' indicó efecto de genotipo [$F_{(1,43)}=16.431$, $P < 0.001$], tratamiento [$F_{(1,43)}=5.594$, $P < 0.001$] e interacción 'genotipo x tratamiento' [$F_{(1,43)}=4.410$, $P < 0.05$] (Figura 20c y 20d).

La variable de 'latencia de acicalamiento' mostró efecto de genotipo [$F_{(1,43)}=26.950$, $P < 0.001$] debido a que se atrasaba en el tiempo en los ratones 3xTg-AD con respecto a los otros dos grupos NTg. Respecto a la variable 'número total de acicalamiento' no indicó efecto de genotipo y tratamiento pero sí se observó efecto de interacción 'genotipo x tratamiento' [$F_{(1,43)}=8.718$, $P < 0.01$] debido a una disminución de la conducta en los grupos de ratones 3xTg-AD con respecto a los otros dos grupos NTg.

En el 'número total de orina' se observó efecto de genotipo [$F_{(1,43)}=11.133$, $P < 0.01$] debido que los grupos de ratones 3xTg-AD presentaron mayor incidencia de orina con respecto a los otros dos grupos NTg. (Figura 20f).

Test de interacción social en un ambiente nuevo (TIS)

En esta prueba se analizaron dos tipos de conductas: las sociales (Figura 21a-21c y Tabla 19) y las no-sociales (Figura 22a y 22b y Tabla 19).

El modelo lineal general multivariante, seguido de un análisis de varianza ANOVA y la comparación post-hoc Tukey B, indicó que los cuatro componentes conductuales que se distinguen: ‘contacto cara/cuerpo’, ‘contacto anogenital’, ‘cola vibrante’ y ‘contacto agresivo’, presentaron latencias de aparición y duración distinta en función del genotipo y tratamiento (Tabla 19).

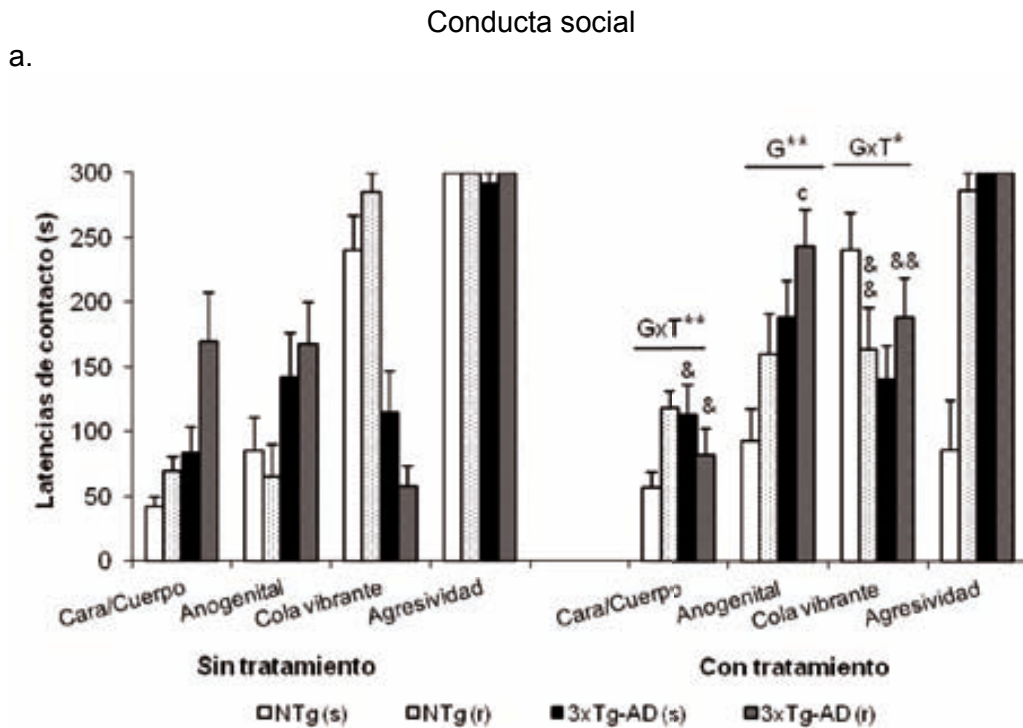
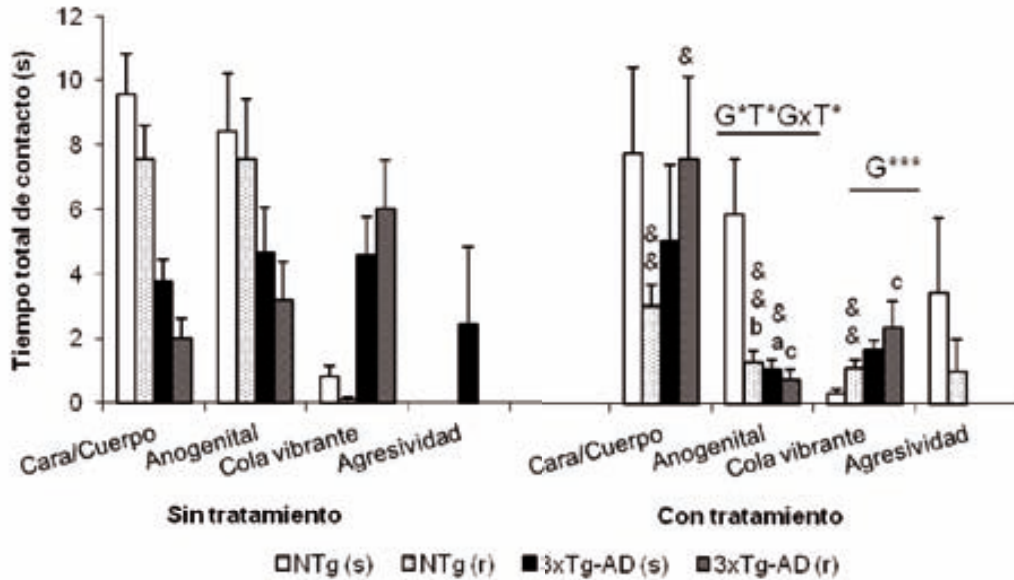


Figura 21a. Conducta social, en las fases sin tratamiento y con tratamiento. (a) latencias (s). ANOVA 2x2, efecto genotipo (G), interacción genotipo x tratamiento (GxT), ** $P < 0.01$ y * $P < 0.05$. Post-hoc Tukey B test * $P < 0.05$. vs. todos los otros grupos experimentales; ^a $P < 0.05$ vs. distinto genotipo pero el mismo tratamiento y ^c $P < 0.05$ vs. distinto genotipo y distinto tratamiento. Efecto *t*-test para datos pareados, efecto tratamiento: tratamiento con una dosis de 0.1 mg/kg vs sin tratamiento, && $P < 0.01$ y & $P < 0.05$.

b.



c.

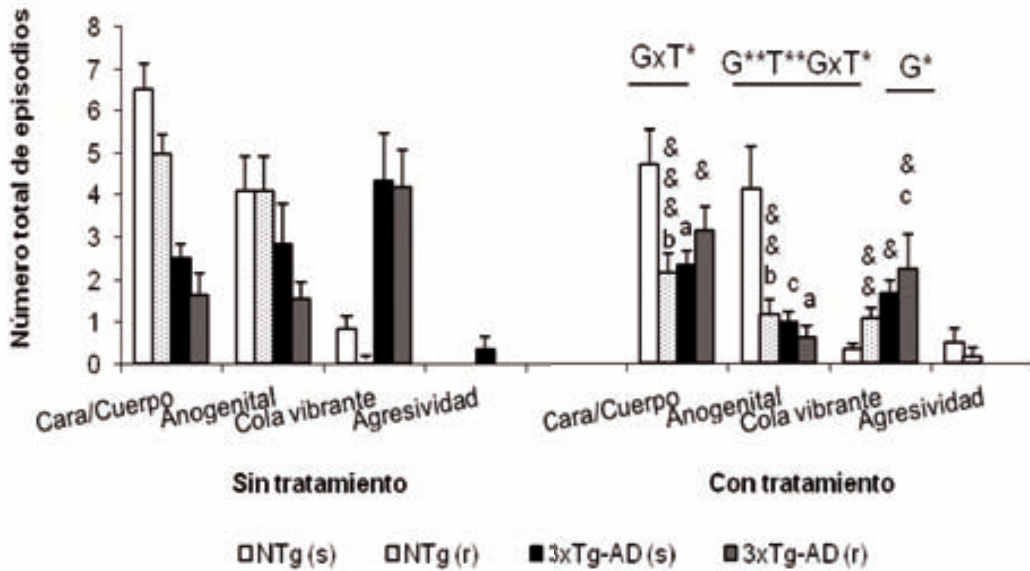


Figura 21b-c. Conducta social en las fases sin tratamiento y con tratamiento. (b) tiempo total y (c) número total. ANOVA 2x2, efecto genotipo (G), interacción genotipo x tratamiento (GxT), ** $P < 0.01$ y * $P < 0.05$. Post-hoc Tukey B test * $P < 0.05$. vs. todos los otros grupos experimentales; ^a $P < 0.05$ vs. distinto genotipo pero el mismo tratamiento; ^b $P < 0.05$ vs. distinto tratamiento pero el mismo genotipo y ^c $P < 0.05$ vs. distinto genotipo y distinto tratamiento. Efecto *t*-test para datos pareados, efecto tratamiento: tratamiento con una dosis de 0.1 mg/kg vs sin tratamiento, &&& $P < 0.001$, && $P < 0.01$ y & $P < 0.05$.

Tabla 19. Conducta social y no-social

	GENOTIPO	TRATAMIENTO	GENOTIPO X TRATAMIENTO	POST-HOC TUKEY B TEST
CONDUCTA SOCIAL				
NTg(s)=12, NTg(r)=11, 3xTg-AD(s)=12, 3xTg-AD(r) Ver Figura 21				
Contacto cara/cuerpo				
Latencia de contacto de cara/cuerpo (s)	n.s.	n.s.	$F_{(1,43)}=8.4428^{**}$	
Tiempo total (s)	n.s.	n.s.	n.s.	
Número total de episodios	n.s.	n.s.	$F_{(1,43)}=9.199^{**}$	**;3xTg-AD(s), NTg (r)≠NTg(s)
Contacto anogenital				
Latencia de contacto anogenital(s)	$F_{(1,43)}=10.818^{**}$	n.s.	n.s.	**;3xTg-AD(r)≠NTg(s)
Tiempo total (s)	$F_{(1,43)}=6.766^*$	$F_{(1,43)}=5.855^*$	$F_{(1,43)}=4.535^*$	**;3xTg-AD(r,s), NTg(r)≠NTg(s)
Número total de episodios	$F_{(1,43)}=9.264^{**}$	$F_{(1,43)}=7.509^{**}$	$F_{(1,43)}=5.017^*$	***;3xTg-AD(r,s), NTg(r)≠NTg(s)
Cola vibrante				
Latencia de vibración de cola (s)	n.s.	n.s.	$F_{(1,43)}=5.396^*$	**;3xTg-AD(r)≠NTg(s)
Tiempo total (s)	$F_{(1,43)}=7.836^{**}$	n.s.	n.s.	*;3xTg-AD(r)≠NTg(s)
Número total de episodios	$F_{(1,43)}=6.949^*$	n.s.	n.s.	n.s.
Contacto agresivo				
Latencia de contacto agresivo (s)	n.s.	n.s.	n.s.	
Tiempo total (s)	n.s.	n.s.	n.s.	
Número total de episodios	n.s.	n.s.	n.s.	
Tiempo total sin contacto	n.s.	n.s.	n.s.	
CONDUCTA NO-SOCIAL				
Ver Figura 22				
Actividad vertical				
Latencia del primer levantamiento (s)	$F_{(1,43)}=24.813^{***}$	n.s.	n.s.	***;3xTg-AD(r)≠NTg(r)
Número total de levantamiento	$F_{(1,43)}=67.857^{***}$	n.s.	n.s.	***;3xTg-AD(r)≠NTg(s)
Actividad horizontal				
Número total de esquinas	$F_{(1,43)}=89.604^{***}$	n.s.	n.s.	***;3xTg-AD(r)≠NTg(r)
Conducta acicalamiento				
Latencia de acicalamiento (s)	n.s.	n.s.	n.s.	
Número de total de acicalamiento	n.s.	n.s.	n.s.	
Conducta de enterramiento				
Latencia de enterramiento (s)	n.s.	n.s.	n.s.	
Número total de enterramiento	n.s.	$F_{(1,43)}=4.185^*$	n.s.	

Modelo lineal general multivariante, ANOVA y Post-hoc Tukey B Test, *** $P<0.001$, ** $P<0.01$ y * $P<0.05$.

La Figura 21 ilustra los resultados del tratamiento en el estudio longitudinal, es decir, obtenidos en la valoración conductual realizada durante la fase sin tratamiento y en la realizada con tratamiento.

Cuando se realizó una prueba t para datos pareados está indicó cambios significativos en los tres componentes conductuales que se distinguen: 'contacto cara/cuerpo', 'contacto anogenital' y 'cola vibrante', presentaron latencias de aparición y duración distinta. En los ratones NTg (s) la conducta contacto cara/cuerpo presentó una disminución del 'número total de episodios' [$t=2.217$, gl 11, $P<0.05$] (Figura 21c).

En los ratones NTg (r) se observó que la latencia 'cara/cuerpo' se atrasaba en el tiempo [$t=3.006$, gl 10, $P<0.05$] y la latencia 'cola vibrante' se adelantaba [$t=3.738$, gl 10, $P<0.01$] (Figura 21a). Además, se mostró una disminución en el tiempo de contacto 'cara/cuerpo' [$t=4.107$, gl 10, $P<0.01$] y 'anogenital' [$t=3.546$, gl 10, $P<0.01$] y un aumento en 'cola vibrante' [$t=-4.282$, gl 10, $P<0.01$] (Figura 21b). Asimismo, se observó una disminución de número de episodios en 'cara/cuerpo' [$t=5.255$, gl 10, $P<0.001$], 'anogenital' [$t=3.975$, gl 10, $P<0.01$] y un aumento en 'cola vibrante' [$t=-4.282$, gl 10, $P<0.01$] (Figura 21c).

Los ratones 3xTg-AD (s) presentaron una disminución en la duración 'contacto anogenital' [$t=2.520$, gl 11, $P<0.05$] (Figura 21b) y número de episodios de la conducta 'cola vibrante' [$t=2.480$, gl 11, $P<0.05$] (Figura 21c).

Los ratones 3xTg-AD (r) presentaron diferencias estadísticas en la aparición de las conducta 'contacto cara/cuerpo' [$t=2.754$, gl 10, $P<0.05$] y 'cola vibrante' [$t=-4.643$, gl 10, $P<0.01$] adelantándose en el tiempo en la primera y atrasándose en la última (Figura 21a). Estas diferencias se ven también reflejadas en la variable de duración y en el número de episodios donde los animales empleaban mayor tiempo en la conducta 'contacto cara/cuerpo' [$t=-2.443$, gl 10,

$P < 0.05$] y aumentaba el número de episodios 'cara/cuerpo' y disminuía el número de 'cola vibrante' [$t = 2.372$, $gl = 10$, $P < 0.05$] (Figura 21b y 21c).

Cuando se comparan los cuatro grupos entre sí, en la variable 'latencia de contacto cara/cuerpo' el modelo lineal multivariante no mostró efecto genotipo ni tratamiento pero indicó efecto de interacción 'genotipo x tratamiento' [$F_{(1,43)} = 8.4428$, $P < 0.01$]. El efecto interacción también se evidenció en la variable número total de episodios de 'contacto cara/cuerpo' [$F_{(1,43)} = 9.199$, $P < 0.01$] (Figura 21a y 21b).

En la variable 'latencia de contacto anogenital' indicó efecto de genotipo [$F_{(1,43)} = 10.818$, $P < 0.01$] debido que en los grupos de ratones 3xTg-AD aparecía más tardía con respecto a los otros dos grupos NTg. Además, en la variable 'tiempo total de contacto anogenital' se observó efecto de genotipo [$F_{(1,43)} = 6.766$, $P < 0.05$], tratamiento [$F_{(1,43)} = 5.855$, $P < 0.05$] e interacción 'genotipo x tratamiento' [$F_{(1,43)} = 4.535$, $P < 0.05$]. El efecto genotipo también se evidenció en el número total de episodios 'contacto anogenital' [$F_{(1,43)} = 9.264$, $P < 0.01$], tratamiento [$F_{(1,43)} = 7.509$, $P < 0.01$] e interacción [$F_{(1,43)} = 5.017$, $P < 0.05$] esto es debido que los ratones NTg (s) presentaron mayor duración de contacto y número de episodios con respecto a los otros tres grupos experimentales.

En la variable 'latencia de vibración de cola' no se encontraron efectos de genotipo ni de tratamiento pero se observó efecto de interacción 'genotipo x tratamiento' [$F_{(1,43)} = 5.396$, $P < 0.05$]. Asimismo, la variable 'tiempo total' presentó efecto de genotipo [$F_{(1,43)} = 7.836$, $P < 0.01$] al igual que la variable 'número de episodios' [$F_{(1,43)} = 6.949$, $P < 0.05$] debido a que los grupos de ratones 3xTg-AD emplearon mayor tiempo y presentaron un incremento de episodios con respecto a los otros dos grupos NTg.

En el componente de contacto agresivo, no se observaron diferencias significativas en ninguno de los tres componentes

Las conductas no-sociales se estudiaron con el modelo lineal general multivariante, seguido de un análisis de varianza ANOVA y la comparación post-hoc Tukey B, como en el caso anterior. En las Figuras 22a y 22b se ilustra el patrón de estas conductas no-sociales durante las fases sin tratamiento y con tratamiento. Se evaluaron cuatro variables: 'esquina', 'levantamiento', 'acicalamiento' y 'enterramiento'. La latencia y la duración de las variables de actividad locomotora (esquinas, levantamientos) mostraron efecto genotipo mientras el efecto tratamiento se observó solo en la duración de la conducta de enterramiento tal y como se detalla en la Tabla 19 y Figura 22. En el caso de la variable esquina sólo se mide la duración.

La Figura 22 ilustra los resultados del tratamiento en el estudio longitudinal, es decir, obtenidos en la fase sin tratamiento y en la fase con tratamiento a una dosis final de 0.1 mg/kg de risperidona.

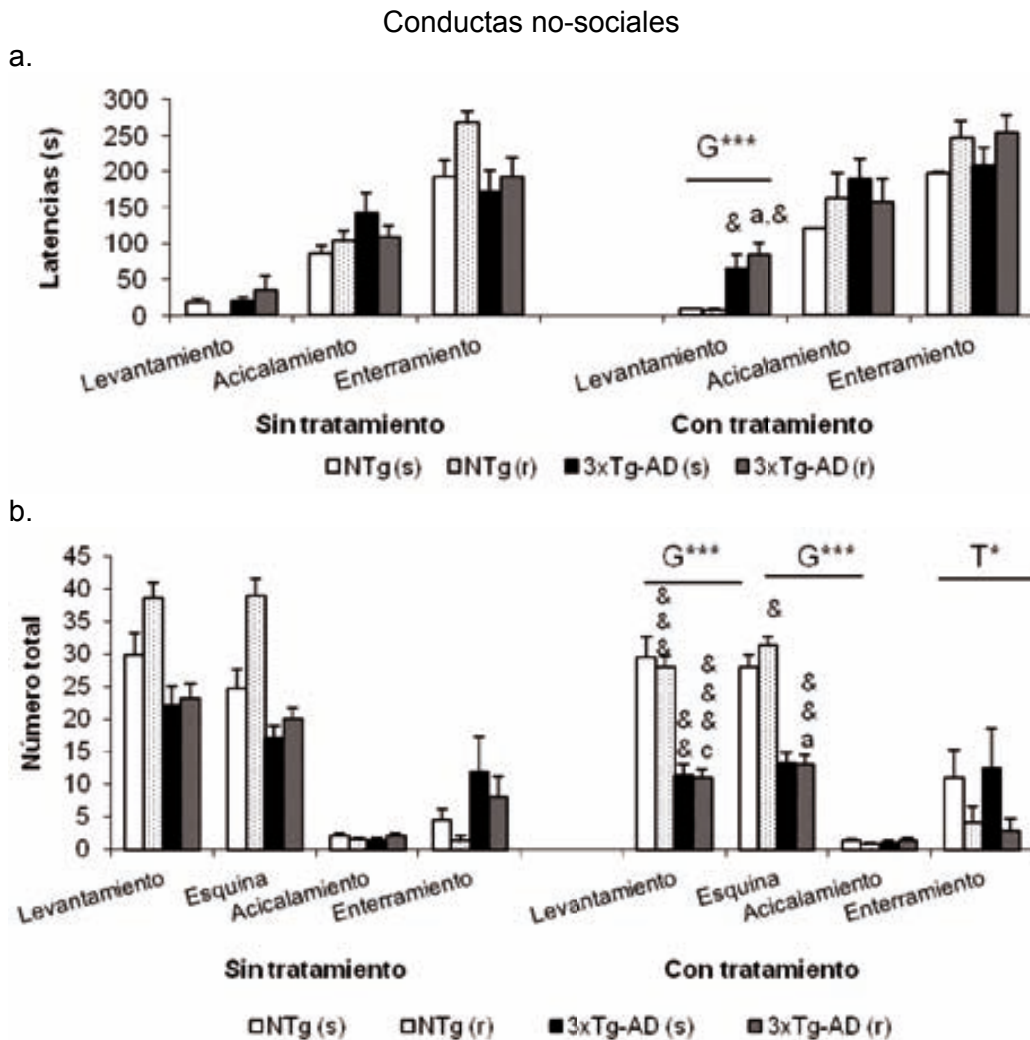


Figura 22. Conductas no-sociales, en las fases sin tratamiento y con tratamiento. (a) latencias (s) y (b) número total. ANOVA 2x2, efecto genotipo (G), tratamiento (T), *** $P < 0.001$ y * $P < 0.05$. Post-hoc Tukey B test ^a $P < 0.05$ vs. distinto genotipo pero el mismo tratamiento y ^c $P < 0.05$ vs. distinto genotipo y distinto tratamiento. Efecto *t*-test para datos apareados, efecto tratamiento: tratamiento con una dosis de 0.1 mg/kg vs sin tratamiento, &&& $P < 0.001$, && $P < 0.01$ y & $P < 0.05$.

Cuando se realizó una prueba *t* para datos apareados, en los ratones NTg (s) no se observó ningún tipo de diferencias mientras que en el grupo de ratones NTg(r) se observaron diferencias estadísticas en la actividad vertical y horizontal donde se observó una disminución del ‘número de levantamientos’

[$t=5.519$, gl 10, $P<0.001$] y en el 'número de esquinas' [$t=2.679$, gl 10, $P<0.001$] (Figura 22a).

En los ratones 3xTg-AD (s) se observó que la 'latencia de levantamiento' se retrasaba en tiempo [$t=-2.205$, gl 11, $P<0.05$] y disminuía el 'número de levantamientos' [$t=3.116$, gl 11, $P<0.01$]. Esto también se evidenció en los ratones 3xTg-AD (r) donde la latencia de 'levantamiento' se retrasaba en el tiempo [$t=-2.323$, gl 10, $P<0.05$], disminuía el 'número de levantamientos' [$t=5.723$, gl 10, $P<0.001$] y además disminuía también el 'número de esquinas visitadas' [$t=3.264$, gl 10, $P<0.01$] (Figura 22a y 22b).

Cuando se comparan los cuatro grupos experimentales entre sí, en la variable 'latencia del primer levantamiento' el modelo lineal multivariante indicó efecto de genotipo [$F_{(1,43)}=24.813$, $P < 0.001$] debido a que en los grupos de ratones 3xTg-AD la latencia se retrasaba en el tiempo con respecto a los dos grupos de NTg. El efecto genotipo también se evidenció en la variable 'número total de levantamientos' [$F_{(1,43)}=67.857$, $P < 0.001$] debido que los ratones 3xTg-AD realizaban menor número de episodios con respecto a los dos grupos de NTg (Figura 22a y 22b).

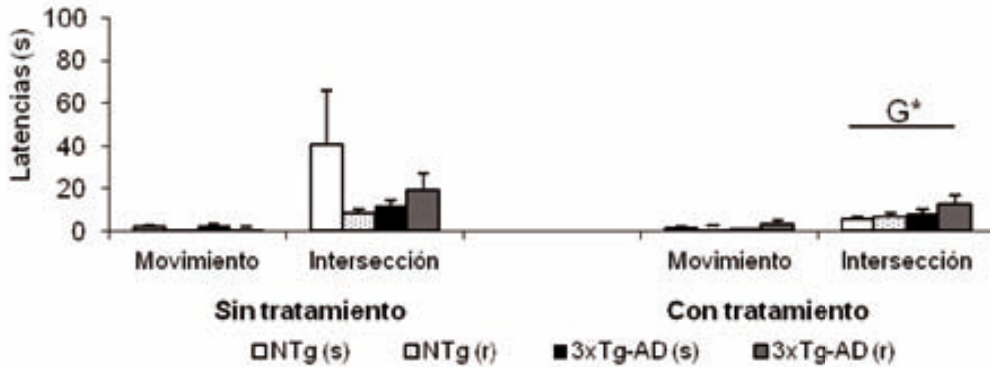
En la variable de actividad horizontal el 'número total de esquinas' indicó efecto de genotipo [$F_{(1,43)}=89.604$, $P < 0.001$] debido que los grupos de ratones 3xTg-AD realizaron menor número de exploración de esquinas con respecto a los dos grupos de ratones NTg.

En la variable 'acicalamiento' no se observaron efectos del factor genotipo ni del tratamiento. Mientras que la variable 'número total de enterramiento' mostró efecto tratamiento [$F_{(1,43)}=4.185$, $P < 0.05$] debido a una disminución de episodios en los ratones 3xTg-AD y NTg con tratamiento con respecto a los ratones 3xTg-AD y NTg a los que se les administró solución salina.

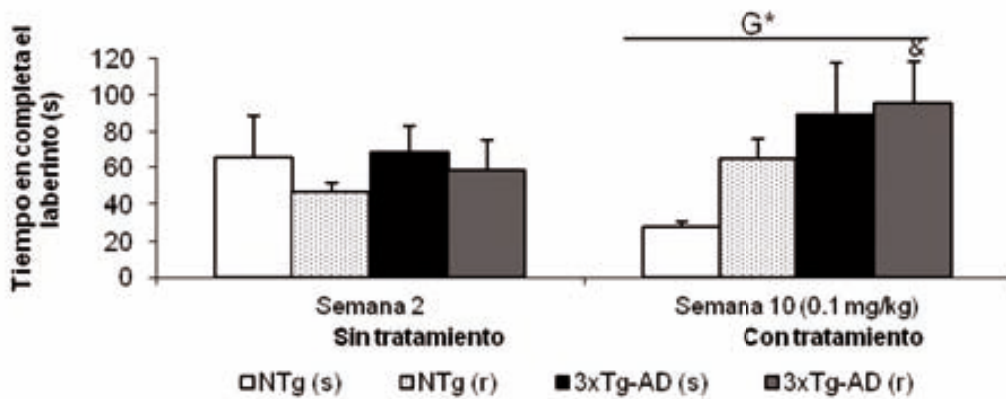
Laberinto en T (TM)

Laberinto en T

a.



b.



c.

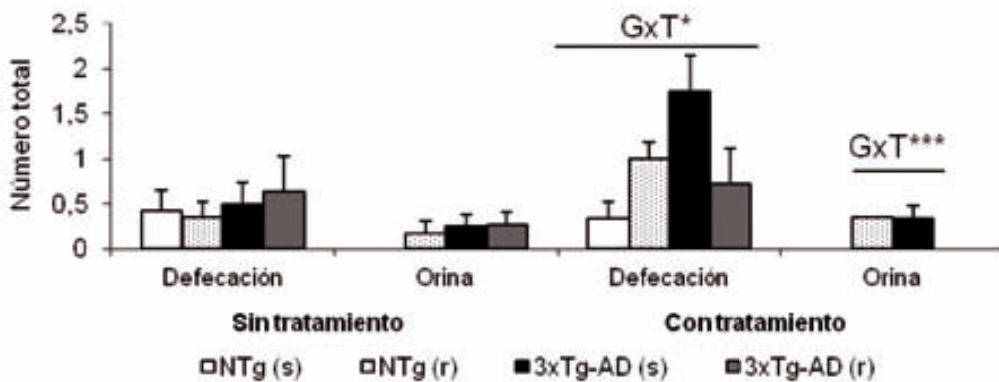


Figura 23. Prueba de Laberinto en T durante la fase sin tratamiento y con tratamiento. (a) latencias (s), (b) tiempo en completar el laberinto (s) y (c) número total de defecaciones y orina. ANOVA 2x2, efecto genotipo (G), intersección genotipo x tratamiento (GxT), *** $P < 0.001$ y * $P < 0.05$. Post-hoc Tukey B test ^a $P < 0.05$ vs. distinto genotipo pero el mismo tratamiento y ^c $P < 0.05$ vs. distinto genotipo y distinto tratamiento. Efecto *t*- test para datos pareados, efecto tratamiento: tratamiento con una dosis de 0.1 mg/kg vs sin tratamiento, && $P < 0.01$ y & $P < 0.05$.

La Figura 23 ilustra los resultados del tratamiento en el estudio longitudinal, en la fase sin tratamiento y en la realizada con tratamiento. Cuando se realizó una prueba *t* para datos pareados ésta indicó diferencias estadísticas solo en grupos de ratones 3xTgAD. Así, los ratones 3xTgAD (s) mostraron un aumento en el número de defecaciones después del tratamiento [$t=-4.486$, gl 11, <4.902 , $P<0.01$]. En caso de los ratones 3xTg-AD (r) los cambios fueron en las variables ‘tiempo en completar el laberinto’ [$t=-2.578$, gl 10, <4.902 , $P<0.05$] debido que emplearon mayor tiempo con respecto a la fase 1 sin tratamiento.

Tabla 20. Prueba del laberinto en T

	GENOTIPO	TRATAMIENTO	GENOTIPO X TRATAMIENTO	POST-HOC TUKEY B TEST Ver Figura 23
NTg(s)=12, NTg(r)=11, 3xTg-AD(s)=12, 3xTg-AD(r)=11				
PRUEBA DEL LABERINTO EN T				
Actividad exploratoria horizontal				
Latencia de movimiento (s)	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>
Latencia en cruzar la intersección del laberinto (s)	$F_{(1,43)}=5.668^*$	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>
Tiempo en completar el laberinto (s)	$F_{(1,43)}=6.402^*$	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>
Número de errores	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>
Presencia de defecación y orina				
Número total de bolos fecales	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	$F_{(1,43)}=4.930^*$	*
Número total de orina	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	$F_{(1,43)}=11.381^{**}$	*;3xTgAD(s)≠NTg(s)
Modelo lineal general multivariante, ANOVA y Post-hoc Tukey B Test; *** $P<0.001$, ** $P<0.01$ y * $P<0.05$.				

El modelo lineal general multivariante, seguido de un análisis de varianza ANOVA y la comparación post-hoc Tukey B, indicó que las variables conductuales: latencia en cruzar la intersección y el tiempo en completar el laberinto indicó efecto de genotipo y la presencia de defecaciones y orina mostro efecto interacción como se detalla en la Tabla 20.

Cuando se comparó los cuatro grupos de animales entre sí, con el modelo lineal multivariante en la variable 'latencia en cruzar la intersección' indicó efecto de genotipo [$F_{(1,43)}=5.668, P < 0.05$] debido que los ratones 3xTg-AD se atrasaban en el tiempo con respecto a los dos grupos de ratones NTg. El efecto genotipo también se evidenció en la variable 'actividad exploratoria' [$F_{(1,43)}=4.496, P < 0.05$] debido que los grupos de ratones 3xTg-AD realizaban mayor número de episodios con respecto a los dos grupos de NTg.

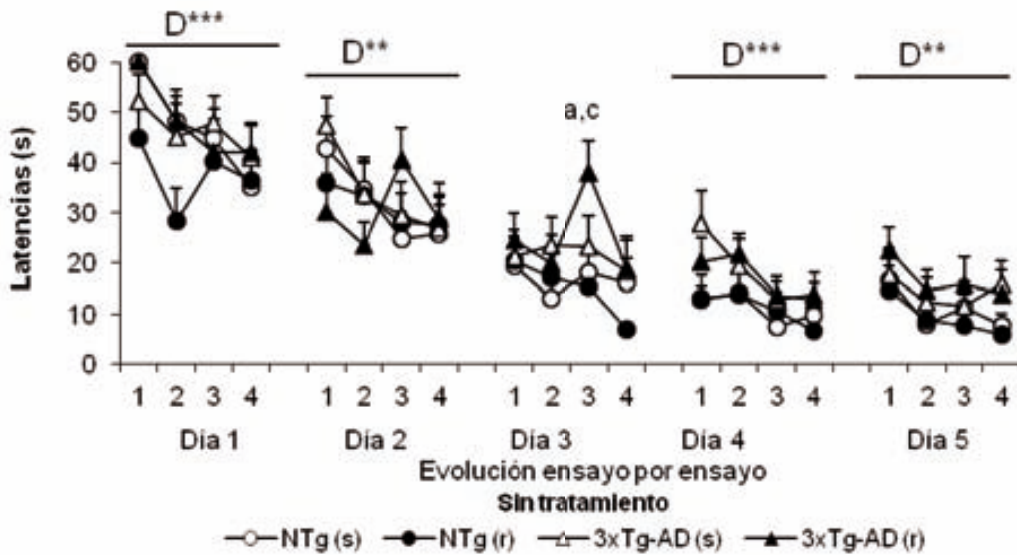
En la variable 'número de bolos fecales' no indicó efecto de genotipo ni tratamiento pero si de interacción 'genotipo x tratamiento' [$F_{(1,43)}=4.930, P < 0.05$]. El efecto interacción también estuvo presente en el 'número total de orina' [$F_{(1,43)}=11.381, P < 0.01$].

Laberinto acuático de Morris (MWM)

Con la finalidad de evaluar el aprendizaje y memoria se aplicó el laberinto acuático de Morris. En esta prueba se analizaron dos tipos de paradigmas para evaluar los distintos procesos y aspectos del aprendizaje y la memoria: tarea de aprendizaje de la posición de la plataforma '*place task for reference memory*' y la eliminación de la plataforma '*removal*'.

Laberinto acuático de Morris

a.



b.

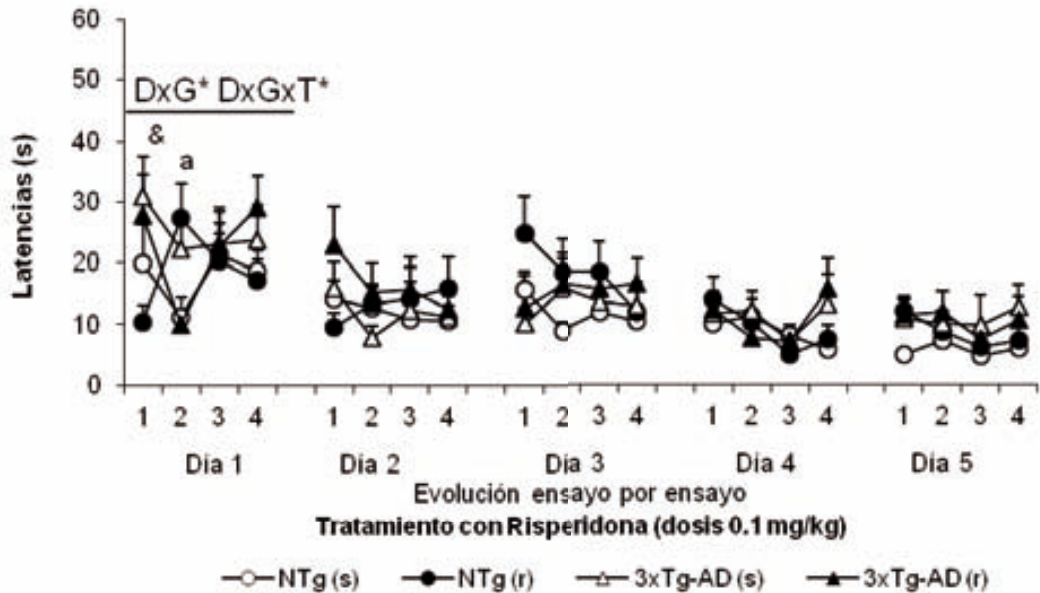
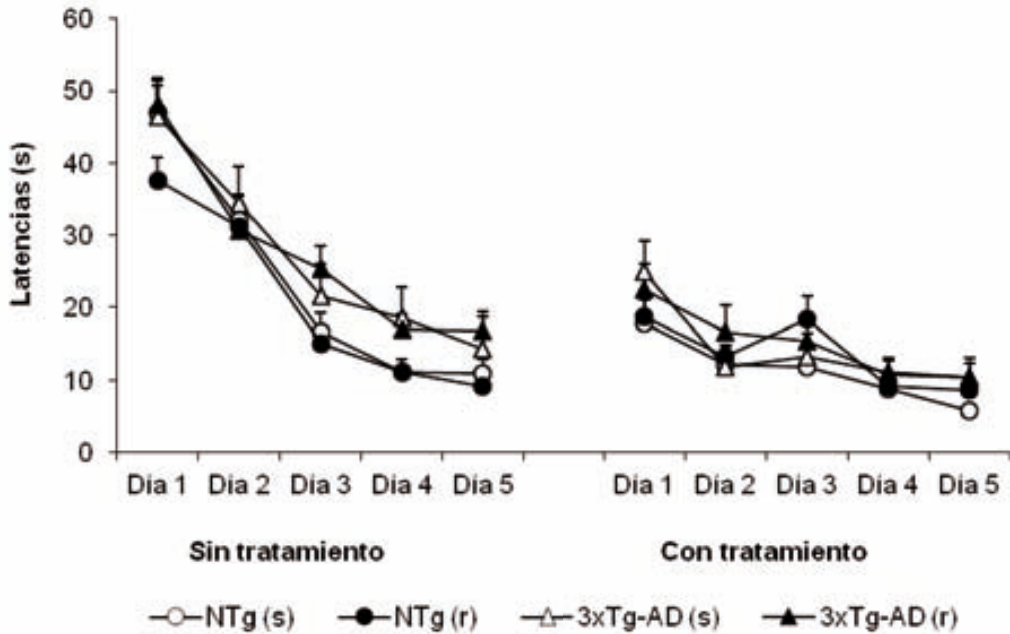


Figura 24a-b. Laberinto acuático de Morris, evolución de aprendizaje y memoria ensayo por ensayo. (a) Latencia (s) sin tratamiento y (b) latencia (s) con tratamiento. ANOVA para medidas repetidas, 2x2x4, efecto día (D), efecto día x genotipo (DxG) y efecto interacción (DxGxT), * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ y *** $P < 0.001$. Post-hoc Tukey B test ^a $P < 0.05$ vs. distinto genotipo pero en el mismo tratamiento y ^c $P < 0.05$ vs. distinto genotipo y distinto tratamiento. *t*-test para datos pareados, efecto tratamiento: Ensayo 1 del día 1 con tratamiento vs ensayo 4 del día 5 sin tratamiento, [&] $P < 0.05$.

Laberinto acuático de Morris.

c.



d.

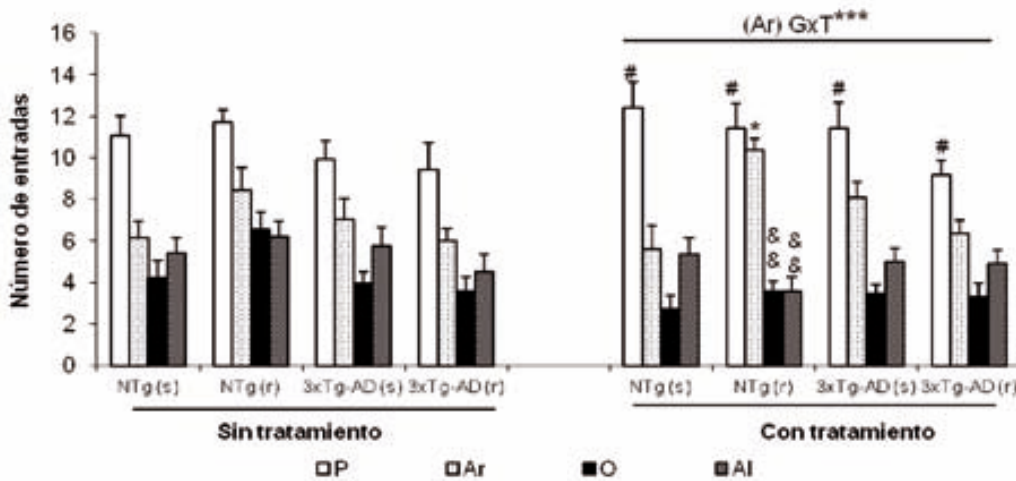


Figura 24c-d. Laberinto acuático de Morris. (c) latencia (s), evolución de aprendizaje y memoria día por día. Medidas repetidas ANOVA 2x2x5, *n.s.* y Post-hoc Tukey B test, *n.s.* (d) número total de entradas en el cuadrante: plataforma (P), derecho (Ar), opuesto (O) e izquierdo (AI). ANOVA 2x2, efecto intersección genotipo x tratamiento (GxT), ****P*<0.001. *t*-test para datos pareados, ****P*<0.001. efecto tratamiento: tratamiento con una dosis de 0.1 mg/kg vs sin tratamiento, &&*P*<0.01 y &*P*<0.05.

Tabla 21. Laberinto acuático de Morris

	GENOTIPO	TRATAMIENTO	GENOTIPO X TRATAMIENTO	POST-HOC TUKEY B TEST
	NTg(s)=12, NTg(r)=11, 3xTg-AD(s)=12, 3xTg-AD(r)=11			Ver Figura 24
LABERINTO ACUÁTICO DE MORRIS-PRUEBA de RETIRADA de la PLATAFORMA				
<i>Número de entradas en cuadrante</i>				
Cuadrante Plataforma (P)	n.s.	n.s.	n.s.	
Cuadrante Derecho (Ar)	n.s.	n.s.	$F_{(1,43)}=19.401^{***}$	**; NTg(r)≠NTg(s), 3xTg-AD(r)
Cuadrante Opuesto (O)	n.s.	n.s.	n.s.	
Cuadrante Izquierdo (AI)	n.s.	n.s.	n.s.	
<i>Porcentaje de permanencia en cuadrante</i>				
Cuadrante Plataforma (P)	n.s.	n.s.	n.s.	
Cuadrante Derecho (Ar)	n.s.	$F_{(1,43)}=5.901^*$	$F_{(1,43)}=10.810^{**}$	**; NTg(r)≠NTg(s), 3xTg-AD(r)
Cuadrante Opuesto (O)	n.s.	n.s.	n.s.	
Cuadrante Izquierdo (AI)	n.s.	n.s.	$F_{(1,43)}=5.555^*$	**; 3xTg-AD(r)≠NTg(r)
Modelo lineal general multivariante, ANOVA y Post-hoc Tukey B test; *** $P<0.001$, ** $P<0.01$ y * $P<0.05$.				

La Figura 24 ilustra los resultados del tratamiento en el estudio longitudinal, es decir, obtenidos en la valoración conductual realizada durante la fase sin tratamiento y en la realizada con tratamiento. Cuando se realizó una prueba t para datos pareados ésta indicó cambios significativos en el paradigma 'evolución día por día' debido a que presentaron latencias distintas antes y después del tratamiento, empleando menor tiempo en encontrar la plataforma. En los ratones NTg (s) presentaron diferencias estadísticas en los días 1, 2 y 5 [todas las $t > 2.484$, gl 11, $P < 0.05$], los ratones NTg (r) en el día 1 y 2 [todas las $t > 1.866$, gl 10, $P < 0.01$], los 3xTg-AD (s) desde el día 1 hasta el 4 [todas las $t > 1.950$ gl 11, $P < 0.01$] al igual que los 3xTg-AD (r) [todas las $t > 2.096$ gl 11, $P < 0.01$].

En la fase sin tratamiento en el paradigma 'ensayo por ensayo' el análisis de la varianza con medidas repetidas indicó efecto en el 'tiempo/días' en el día 1 [$F_{(3,144)}=9.914$, $P < 0.001$], en el día 2 [$F_{(3,144)}=4.082$, $P < 0.01$], en el día 4 [$F_{(3,144)}= 7.242$, $P < 0.001$] y en el día 5 [$F_{(3,144)}=4.934$, $P < 0.01$]. Cuando se analizó la fase con tratamiento solo se observó en el día 1 efecto 'día x genotipo' [$F_{(3,144)}=2.664$, $P < 0.05$] y 'día x genotipo x tratamiento' [$F_{(3,144)}=3.766$, $P < 0.05$]. Además, en el paradigma 'evolución día por día' no se observaron diferencias en la fase sin tratamiento ni en la fase con tratamiento.

Cuando se evaluó el paradigma 'ensayo x ensayo' solo se observaron cambios significativos en el grupo de ratones NTg (s) en la comparación del ensayo 1 del día 1 con tratamiento con respecto al ensayo 4 del día 5 sin tratamiento [$t = -2.239$, gl 11, $P < 0.05$] debido que empleaban mayor tiempo en encontrar la plataforma (Figura 24a-b).

Cuando se comparó los cuatro grupos de animales entre sí en la fase con tratamiento, con el modelo lineal multivariante no indicó diferencia significativas en el paradigma 'evolución día por día' entre los cuatro grupos experimentales (Figura 24c).

El segundo paradigma consistió en la desaparición de la plataforma 'removal' y se realizó 1h 30 min después del último ensayo de 'place task' en el día 5.

Cuando se realizó un análisis de la varianza ANOVA y la comparación post Tukey B para analizar qué nivel de cuadrante presentó mayor número de entradas en un grupo de animales donde se observó (Figura 24d):

En la fase sin tratamiento los ratones NTg (s) mostraron mayor 'número de entradas en el cuadrante donde se ubicaba la plataforma' [$F_{(3,47)} = 13.48, P < 0.001$] con respecto a los otros cuadrantes. En los ratones NTg (r) se observó el mismo patrón conductual [$F_{(3,43)} = 9.62, P < 0.001$]. Los ratones 3xTg-AD (s) presentaron mayor 'número de entradas en el cuadrante de la plataforma y en cuadrante derecho' [$F_{(3,47)} = 8.80, P < 0.001$] y los ratones 3xTg-AD (r) se observó mayor 'número de entradas en el cuadrante de la plataforma' [$F_{(3,43)} = 8.14, P < 0.001$].

En la fase con tratamiento en los ratones NTg (s) se observó un incremento del número de entradas en el 'cuadrante de la plataforma' [$F_{(3,47)} = 18.91, P < 0.001$] con respecto a los otros cuadrantes. En los otros grupos experimentales se observó un aumento de entradas tanto en el 'cuadrante de la plataforma como el cuadrante derecho NTg (r) [$F_{(3,43)} = 31.18, P < 0.001$], en los ratones 3xTg-AD (s) [$F_{(3,47)} = 18.91, P < 0.001$] y en los ratones 3xTg-AD (r) [$F_{(3,43)} = 15.27, P < 0.001$] (Tabla 21).

La Figura 24d ilustra los resultados del tratamiento en el estudio longitudinal, en la fase sin tratamiento y en la realizada con tratamiento. Cuando se realizó una prueba *t* para datos pareados ésta indicó diferencias estadísticas solo en el grupo de ratones NTg (r) que disminuyeron el número de entradas en el cuadrante opuesto [$t = 3.203, gl 10, P < 0.01$] e izquierdo [$t = 3.909, gl 10, P < 0.01$] (Figura 24c) respecto a lo realizado en esta misma prueba antes del tratamiento.

Cuando se comparó los cuatro grupos de animales entre sí, con el modelo lineal multivariante en el segundo paradigma que consistió en la desaparición de la plataforma 'removal', la variable 'número de entradas en el cuadrante derecho' indicó efecto de interacción 'genotipo x tratamiento' [$F_{(1,43)}=19.401, P < 0.001$] y no mostró efecto genotipo ni tratamiento.

Test de enterramiento de mármoles (MBT)

En este test se evaluó la conducta de enterramiento en una escala de tres niveles: mármoles 'intactos', 'cambiados de posición' y 'enterrados' (Figura 25 y Tabla 22).

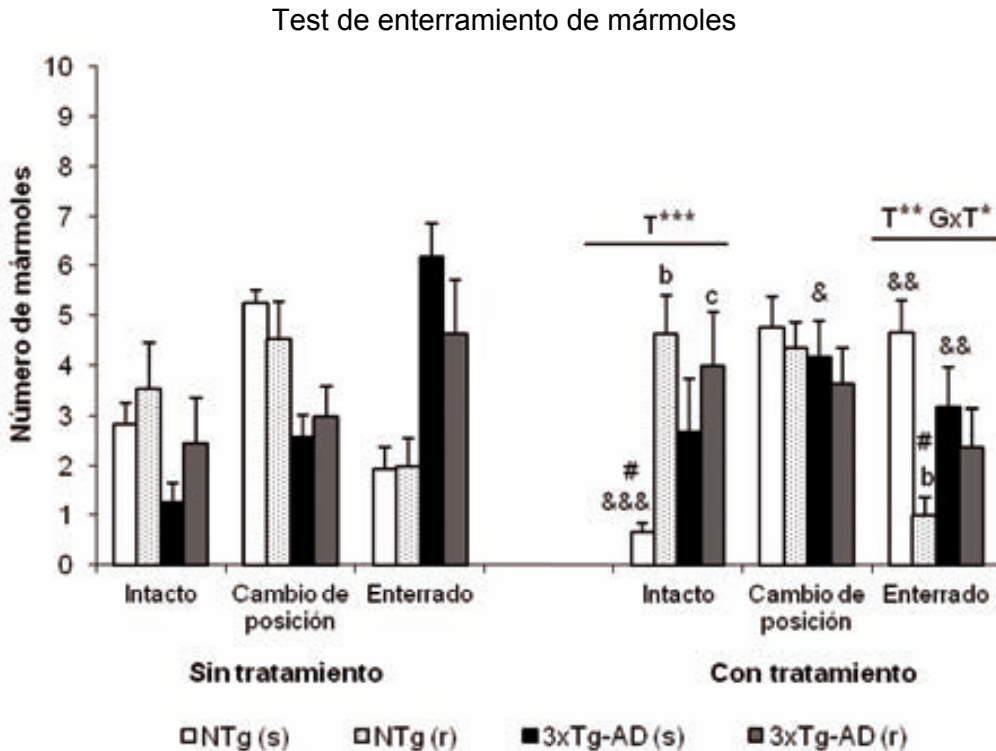


Figura 25. Test de enterramiento de mármoles durante la fase sin tratamiento y con tratamiento. (b) número de mármoles. *t*- test para datos pareados, efecto tratamiento: tratamiento con una dosis de 0.1 mg/kg vs sin tratamiento, &&& $P < 0.001$, && $P < 0.01$ y & $P < 0.05$. ANOVA y Post-hoc Tukey B test interacción de los tres niveles # $P < 0.001$. ANOVA 2x2, T, efecto tratamiento y GxT, intersección genotipo x tratamiento, *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$ y * $P < 0.05$. Post-hoc Tukey B test ^b $P < 0.05$ vs. distinto tratamiento pero el mismo genotipo y ^c $P < 0.05$ vs. distinto genotipo y distinto tratamiento.

La Figura 25 ilustra los resultados del tratamiento en el estudio longitudinal, es decir, obtenidos en la valoración conductual realizada durante la fase sin tratamiento y en la realizada con tratamiento.

Cuando se realizó un análisis de la varianza ANOVA y la comparación post Tukey B para analizar qué nivel de interacción con los mármoles fue más frecuente en un grupo de animales dado se observó que:

En la fase con tratamiento los ratones NTg (s) los mármoles 'intactos' fueron los menos frecuentes en comparación con los mármoles cambiados de posición y enterrados [$F_{(2,35)} = 19.51, P < 0.001$]. En los ratones NTg (r) mostraron un incremento del número de mármoles 'intacto' y una disminución de mármoles 'enterrados' [$F_{(2,32)} = 13.05, P < 0.001$]. En los dos grupos de ratones 3xTg-AD no se observaron cambios significativos entre los tres niveles.

Cuando se realizó una prueba *t* para datos pareados para comparar la conducta realizada durante las fases antes y después del tratamiento, ésta indicó diferencias en los ratones NTg (s) en las variables número de mármol 'intacto' [$t = 5.348, gl\ 11, P < 0.001$] y 'enterrados' [$t = -3.824, gl\ 11, P < 0.001$] debido a que después del tratamiento se observó una disminución en el número de mármoles intactos y un aumento de número de mármoles en enterrados (Figura 25b).

En los ratones 3xTg-AD (s) se observó un incremento del número de mármol 'cambiados de posición' [$t = -2.601, gl\ 11, P < 0.05$] y una disminución de mármol 'enterrados' [$t = 3.348, gl\ 11, P < 0.01$]. En los grupos de animales tratados con risperidona NTg (r) y 3xTg-AD (r) no se observaron cambios.

Tabla 22. Test de enterramiento de mármoles

GENOTIPO	TRATAMIENTO	GENOTIPO X TRATAMIENTO	POST-HOC TUKEY B TEST Ver Figura 25
NTg(s)=12, NTg(r)=11, 3xTg-AD(s)=12, 3xTg-AD(r)=11			

PRUEBA DE ENTERRAMIENTO DEL MÁRMOL

Numero de mármoles				
Intacto	<i>n.s.</i>	$F_{(1,43)}=7.802^{**}$	<i>n.s.</i>	**; $3xTgAD(r), NTg(r) \neq NTg(s)$
Cambiado de posición	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	
Enterrado	<i>n.s.</i>	$F_{(1,43)}=8.573^{**}$	$F_{(1,43)}=6.114^*$	**; $NTg(r) \neq NTg(s)$

Modelo lineal general multivariante, ANOVA y Post-hoc Tukey B test; ** $P < 0.01$ y * $P < 0.05$.

Cuando se compararon los cuatro grupos de animales entre sí (Figura 25b y Tabla 22) con el modelo lineal multivariante, la variable ‘número de mármoles intactos’ mostró efecto tratamiento [$F_{(1,43)}=7.802, P < 0.01$] con un aumento de la presencia de mármoles intactos en los grupos tratados con risperidona respecto a los tratados con salino, y no se observó efecto genotipo ni interacción entre ambos factores.

La variable ‘número de mármoles enterrados’ indicó efecto de tratamiento [$F_{(1,43)}=8.573, P < 0.01$] debido que los grupos con risperidona mostraron menor número de mármoles enterrados en comparación con los tratados con salino, aunque esta disminución es solo significativa en el caso de los animales NTg (r). Además, en esta variable se observó efecto de interacción ‘genotipo x tratamiento’ [$F_{(1,43)}=6.114, P < 0.05$] debido que se observó una disminución del número de mármoles enterrados en los ratones NTg (r) y un aumento en los ratones 3xTg-AD (r).

Estado basal de la glucosa en sangre

En esta prueba se evaluó el estado basal de los niveles de la glucosa en los cuatro grupos experimentales. Los resultados se ilustran en la Tabla 23 y Figura 26.

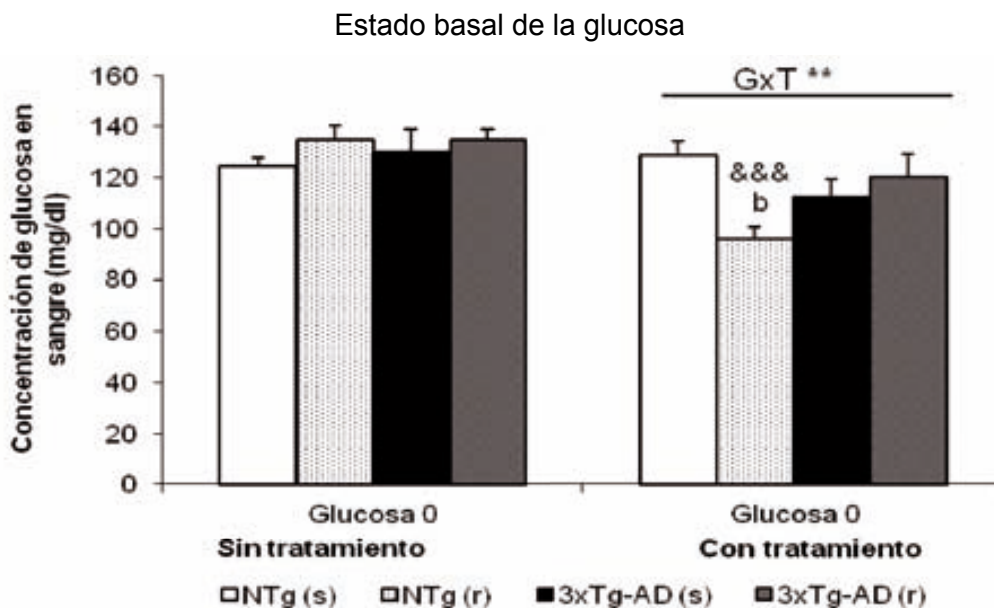


Figura 26. Estado basal de la glucosa durante la fase sin tratamiento y con tratamiento. *t*-test para datos pareados, efecto tratamiento: tratamiento con una dosis de 0.1 mg/kg vs sin tratamiento, &&& P <0.001. ANOVA 2x2, efecto intersección genotipo x tratamiento (GxT), ** P <0.01. Post-hoc Tukey B test ^b P <0.05 vs. distinto tratamiento pero el mismo genotipo.

Tabla 23. Estado basal de la glucosa

	GENOTIPO	TRATAMIENTO	GENOTIPO X TRATAMIENTO	POST-HOC TUKEY B TEST Ver Figura 26
NTg(s)=12, NTg(r)=11, 3xTg-AD(s)=12, 3xTg-AD(r)=11				
ESTADO BASAL GLUCOSA				
<i>Concentración de glucosa en sangre</i>				
Estado basal	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	$F_{(1,43)}=9.441^{**}$	*; NTg(r)≠NTg(s)
Modelo lineal general multivariante, ANOVA y Post-hoc Tukey B test; *** P <0.001, ** P <0.01 y * P <0.05.				

La Figura 26 ilustra los resultados del tratamiento en el estudio longitudinal, es decir, obtenidos en la valoración conductual realizada durante la fase sin tratamiento y en la realizada con tratamiento.

Cuando se realizó una prueba t para datos pareados ésta indicó diferencias solo en el caso de los ratones NTg (r) y para la variable estado 'basal de la glucosa' [$t=7.611$, gl 11, $P<0.001$] debido a que se observó una disminución con respecto a la fase sin tratamiento.

Cuando se comparó los cuatro grupos de animales entre sí, con el modelo lineal multivariante la variable estado basal de la glucosa' mostró efecto interacción 'genotipo x tratamiento' [$F_{(1,43)}=9.441$, $P < 0.01$] con disminución de los niveles basales de glucosa solo en el grupo NTg. No se observó efecto genotipo ni de tratamiento.

Fase 5. Supervivencia y peso desde el inicio del proceso experimental hasta el final de la vida de los ratones 3xTg-AD y NTg.

Pesos

En todo el proceso experimental se evaluó el peso corporal (expresado en gramos) de cada uno de los animales.

En la Figura 27 se ilustra el peso de los animales en la caracterización basal al inicio de la fase (semana 1) y al final de la caracterización (semana 6).

Pesos: Fase 1. Caracterización basal

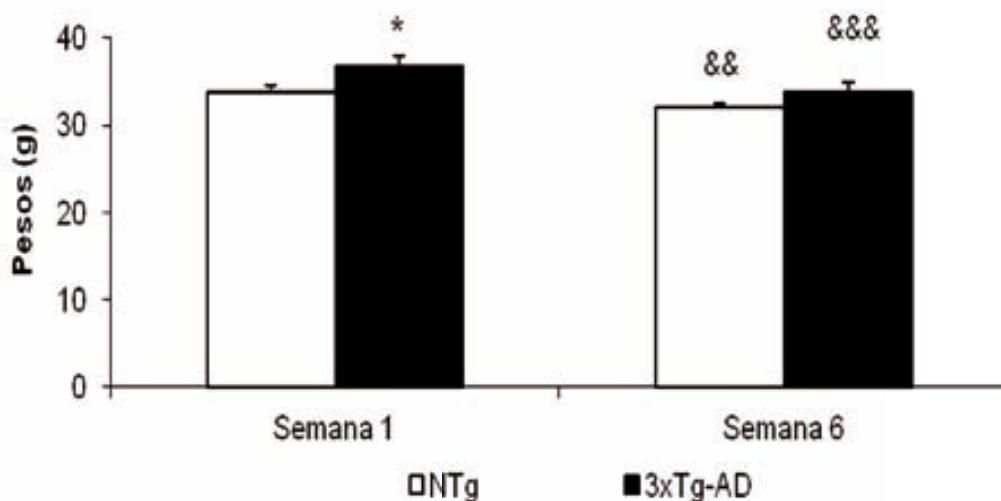


Figura 27. Pesos de los animales en la caracterización basal (Fase 1) en la semana 1 y semana 6. Student's *t*-test; * $P<0.05$. *t*-test para datos pareados, && $P<0.01$ y &&& $P<0.001$.

El peso en la fase sin tratamiento, la comparación para muestras independientes indicó diferencias significativas en la semana 1 [$t=-2.213$, gl 50, $P<0.05$] entre los ratones 3xTg-AD y su control NTg y estas diferencias se atenúan, perdiendo la significación estadística, en la semana 6.

Al comparar el peso al principio y al final de la caracterización basal realizando una prueba *t* para datos pareados ésta indicó diferencias en los ratones NTg en la variable 'peso' [$t=4.035$, gl 23, $P<0.01$] debido a que se observó una disminución del peso. Estas diferencias también se evidenciaron en el grupo de ratones 3xTg-AD [$t=6.234$, gl 27, $P<0.001$].

Pesos: Fase 2. Inicio de tratamiento con risperidona a una dosis de 0.05 mg/kg

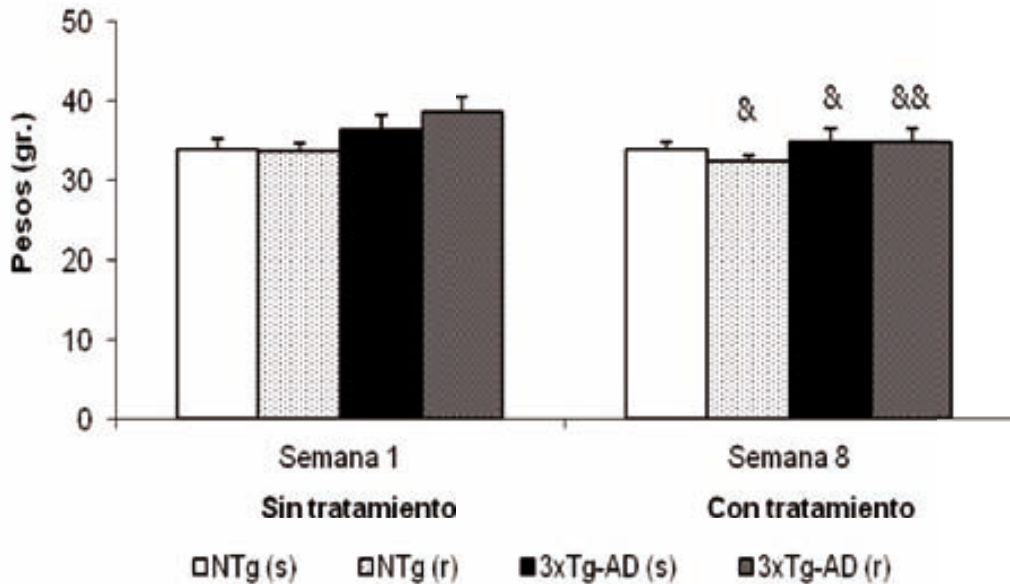


Figura 28. Pesos. *t*-test para datos pareados, efecto tratamiento: tratamiento con una dosis de 0.05 mg/kg vs sin tratamiento, && $P<0.01$ y & $P<0.05$.

La Figura 28 ilustra los resultados del tratamiento en el estudio longitudinal, es decir, obtenidos en la valoración conductual realizada durante la fase sin tratamiento y en la realizada con tratamiento.

Cuando se realizó una prueba *t* para datos pareados ésta indicó diferencias en la variable 'peso' en los ratones NTg (r) [$t= 2.965$, gl 10, $P<0.05$], en los ratones 3xTg-AD (s) [$t= 2.718$, gl 11, $P<0.05$] y en los ratones 3xTg-AD (r) [$t=4.633$, gl 10, $P<0.01$] con una disminución del peso con respecto a la fase sin tratamiento. No se observaron diferencias de peso en los grupos de ratones NTg.

Cuando se comparó los cuatro grupos de animales entre sí, con el modelo lineal multivariante, no indicó diferencia significativa en la variable peso.

Pesos: Fase 3. Tratamiento con risperidona a una dosis de 0.1 mg/kg

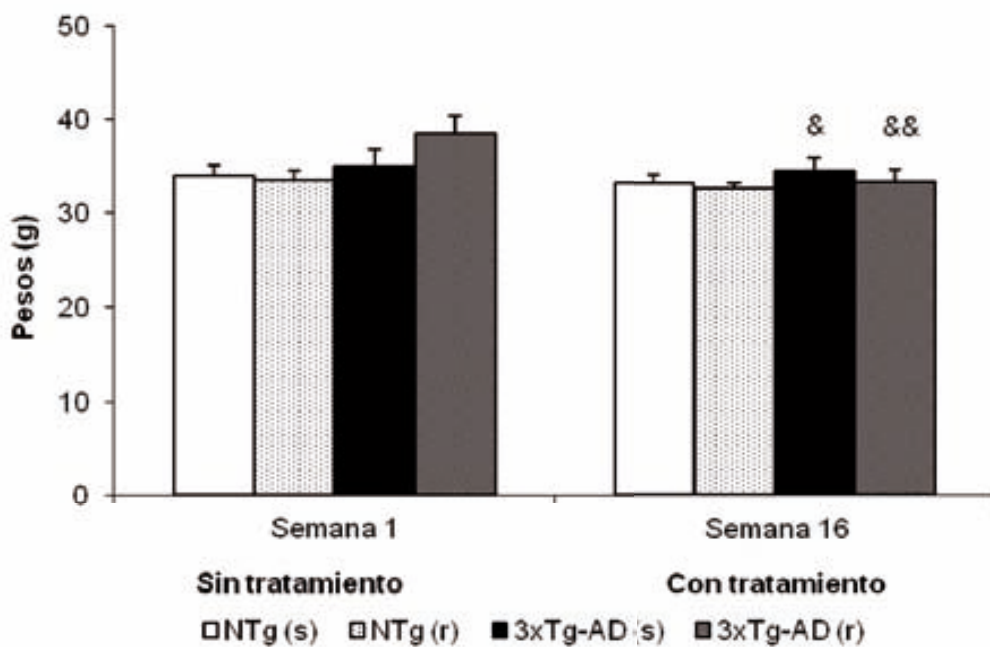


Figura 29. Pesos. *t*-test para datos pareados, efecto tratamiento: tratamiento con una dosis de 0.1 ml/kg vs sin tratamiento $&&P<0.01$ y $&P<0.05$.

La Figura 29 ilustra los resultados del tratamiento en el estudio longitudinal, es decir, obtenidos en la valoración conductual realizada durante la fase sin tratamiento y en la realizada con tratamiento.

Cuando se realizó una prueba *t* para datos pareados ésta indicó diferencias en la variable 'peso' en los ratones 3xTg-AD (s) [$t= 2.312$ gl 11, $P<0.05$] y en los ratones 3xTg-AD (r) [$t= 3.478$, gl 11, $P<0.01$] con una disminución del peso con respecto a la fase sin tratamiento. No se observó diferencias en los grupos de ratones NTg.

Cuando se comparó los cuatro grupos de animales entre sí, con el modelo lineal multivariante no indicó diferencia significativa en la variable peso.

Pesos: Inmediatamente después de la defunción

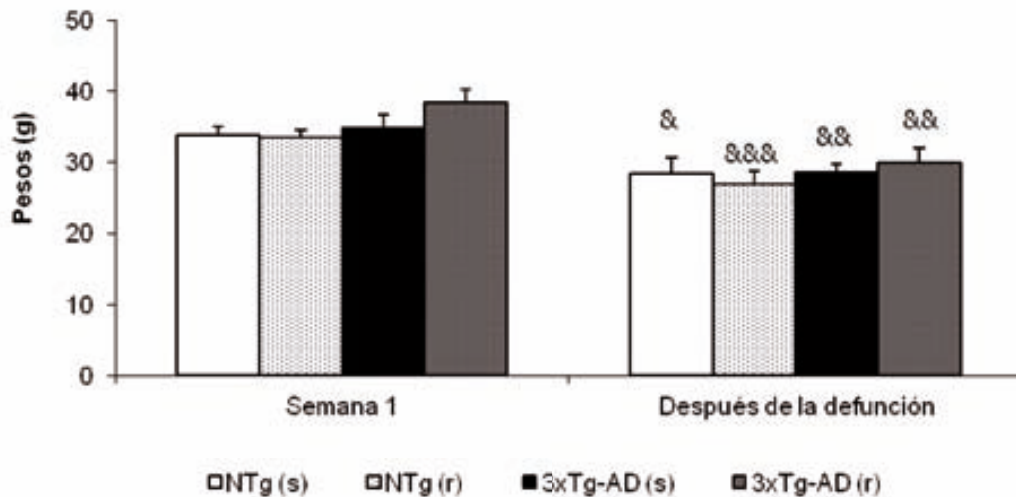


Figura 30. Pesos: Pesos al inicio del estudio longitudinal vs. el peso inmediatamente después de la defunción *t*-test para datos pareados &&& $P < 0.001$, && $P < 0.01$ y & $P < 0.05$.

La Figura 30 ilustra los resultados del tratamiento en el estudio longitudinal, es decir, obtenidos en la valoración conductual realizada durante la fase sin tratamiento y en la fase 5 de seguimiento sin tratamiento 'peso inmediatamente después de la defunción'.

Cuando se realizó una prueba *t* para datos pareados ésta indicó diferencias en la variable 'peso' en los NTg (s) [$t = 2.209$, gl 11, $P < 0.05$], los NTg (r) [$t = 5.382$, gl 10, $P < 0.001$], los ratones 3xTg-AD (s) [$t = 5.721$, gl 11, $P < 0.001$] y los ratones 3xTg-AD (r) [$t = 3.937$, gl 10, $P < 0.01$] esto es debido que los cuatro grupos experimentales en edades avanzadas presentaron una disminución del peso corporal respecto a la primera semana del inicio experimental.

Cuando se compararon los cuatro grupos de animales entre sí, con el modelo lineal multivariante no indicó diferencia significativa en la variable peso.

Curvas de supervivencia

A continuación se representan las curvas de supervivencia de los grupos de ratones NTg y 3xTg-AD administrados con solución salina o con antipsicótico, expresadas con el porcentaje de animales que se mantuvieron vivos da lo largo del procedimiento experimental (Figura 31).

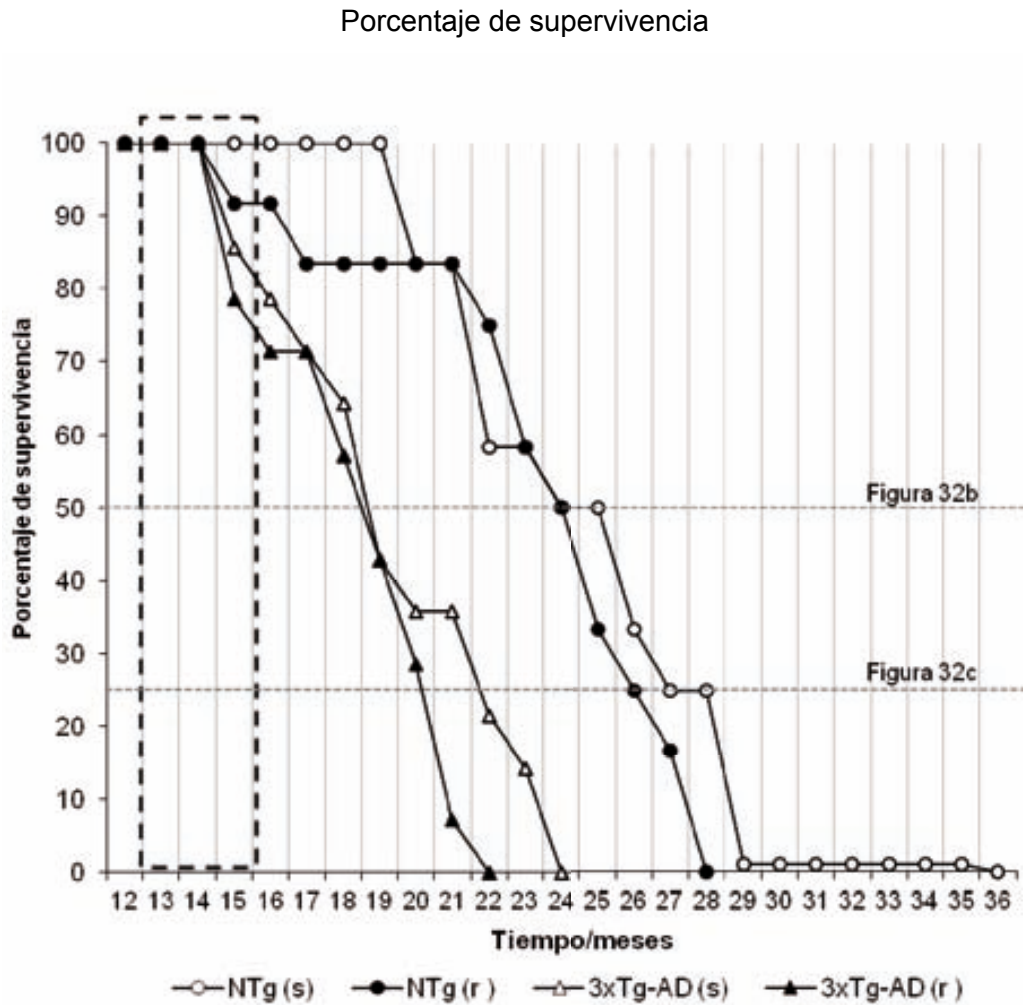


Figura 31. Porcentaje de supervivencia de los animales durante el estudio longitudinal. El área señalada es la fase con tratamiento.

La figura 31 ilustra el porcentaje de supervivencia de los animales durante el estudio longitudinal donde se observa como la supervivencia máxima alcanzada difiere entre los grupos: NTg (s): 1.078 días (36 meses), NTg (r): 874 días (28 meses); 3xTg-AD (s): 768 días (24 meses), 3xTg-AD (r): 660 días (22 meses), con una disminución de la supervivencia máxima de 12 meses en el genotipo 3xTg-AD respecto al genotipo NTg (tomando como referencia los animales tratados con salino). En el genotipo NTg la supervivencia máxima se vió modificada con el tratamiento con risperidona, disminuyendo en 8 meses (pasando de los 36 meses a los 28 meses). En el genotipo Tg la disminución es de 2 meses (pasando de los 24 a los 22 meses).

Supervivencia promedio total

a.

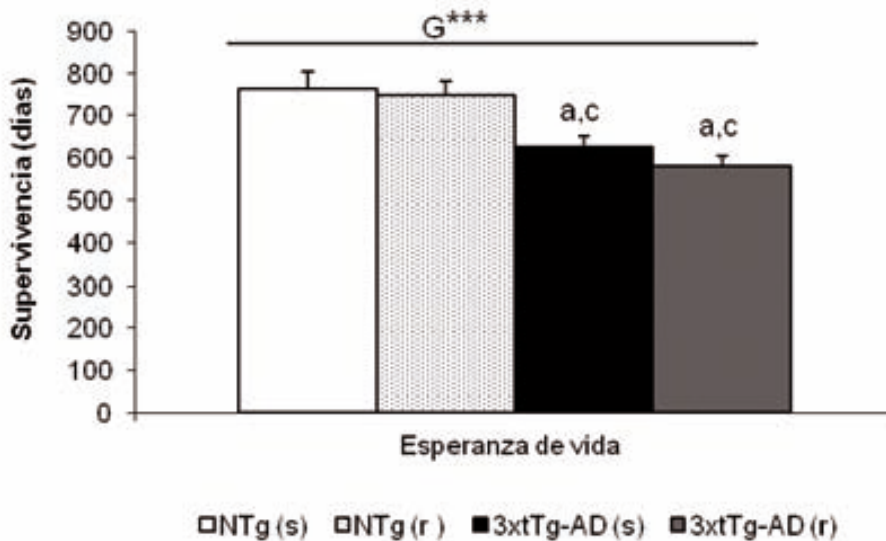
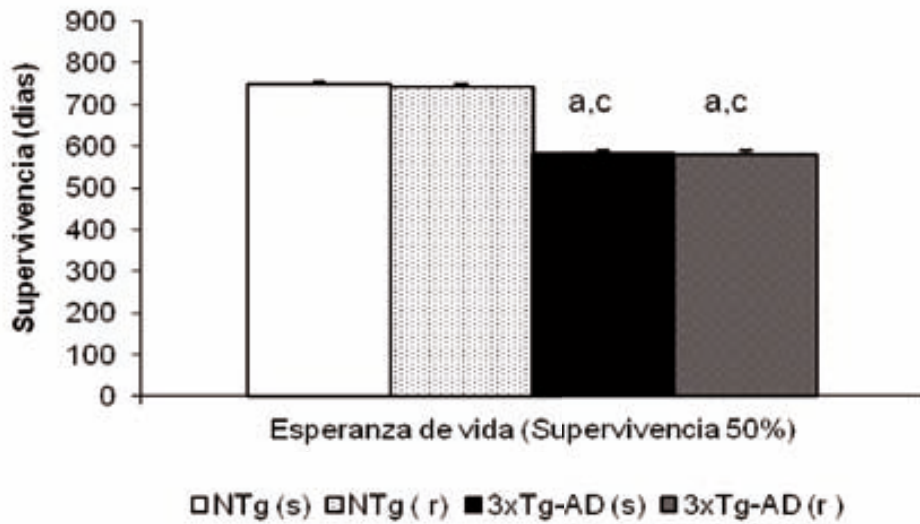


Figura 32a. Supervivencia promedio total. Promedio \pm SEM. ANOVA 2x2, G, efecto genotipo, *** $P < 0.001$. a $P < 0.05$ vs. igual tratamiento pero distinto genotipo, b $P < 0.05$ vs. distinto tratamiento pero el mismo genotipo y c $P < 0.05$ vs. distinto tratamiento distinto genotipo.

b.



c.

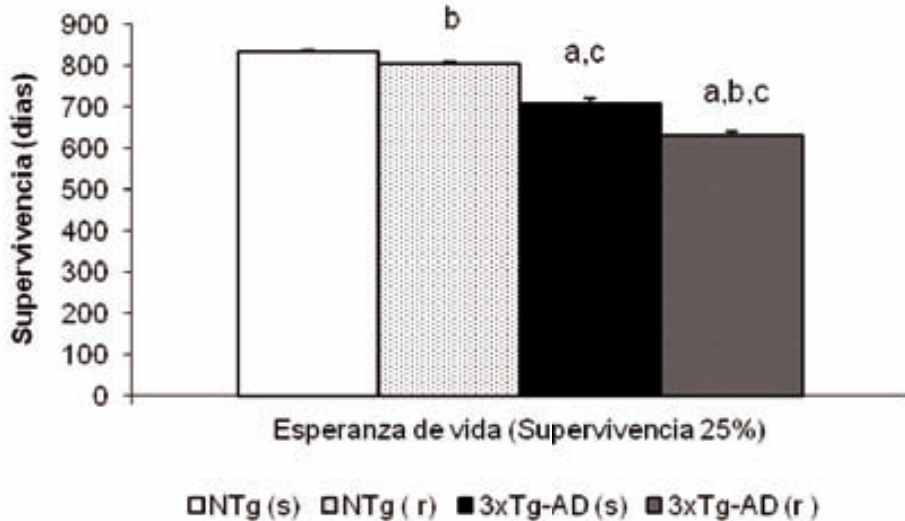


Figura 32b-c. Supervivencia promedio total. Promedio \pm SEM. ANOVA y Post-hoc Tukey B test ^a $P < 0.05$ vs. igual tratamiento pero distinto genotipo, ^b $P < 0.05$ vs. distinto tratamiento pero el mismo genotipo y ^c $P < 0.05$ vs. distinto tratamiento distinto genotipo.

Cuando se compararon los cuatro grupos de animales entre sí con el modelo lineal multivariante, la variable 'supervivencia total' promedio del grupo mostró efecto de genotipo [$F_{(1,48)}=24.812$, $P < 0.001$] pero no indicó efecto de tratamiento ni interacción (Figura 32).

Al analizar las curvas de supervivencia se observó que hasta los 14 meses de edad la supervivencia fue del 100% en todos los grupos. El único que mantiene la supervivencia al 100% a partir de ese momento es el grupo NTg (s) que logra mantener su supervivencia intacta hasta los 19 meses, es decir, 5 meses más que los demás grupos. La mortalidad de la cepa NTg empieza, por tanto, a los 20 meses de edad, está avanzada a los 15 por el hecho de tener incorporados los transgenes o por recibir el tratamiento con risperidona.

A pesar de que el inicio de la mortalidad es de 15 meses para los tres grupos NTg (r), 3xTg-AD (s) y 3xTg-AD (r), en las curvas de supervivencia se observaron cambios de pendiente que indican diferentes grados de supervivencia global en el grupo: NTg (r) con una supervivencia del 91.61%, en los ratones 3xTg-AD (s) del 85.71%, en los ratones 3xTg-AD (r) del 78.48% (Figura 31).

Al realizar una comparación de los cuatro grupos de animales entre sí, con el modelo lineal multivariante ANOVA 2x2 la variable tiempo de supervivencia promedio del grupo a los '15 meses de edad' mostró efecto de genotipo [$F_{(1,45)}=4.968$, $P < 0.05$] e interacción 'genotipo x tratamiento' [$F_{(1,45)}=4.968$, $P < 0.05$] y no mostró efecto de tratamiento.

En los grupos de animales a lo largo de la curva de supervivencia se observaron efectos a distintos tiempos. Así, se evidenció un efecto genotipo a los '18 meses de edad' [$F_{(1,41)}=3.191$, $P < 0.05$] y a los 22 meses de edad [$F_{(1,26)}=6.375$, $P < 0.01$] y no mostró efecto tratamiento ni interacción en ambos tiempos (Figura 31).

Cuando se compararon los grupos de animales para valorar la esperanza de vida media (50% de la supervivencia), el análisis de la varianza ANOVA indicó diferencias significativas entre los cuatro grupos [$F_{(3,28)} = 262.25$, $P < 0.001$]. En los ratones NTg la esperanza de vida media se ubicó a los 24 meses de edad, mientras que en los dos grupos de ratones 3xTg-AD la esperanza de vida media se situó en los 18 meses de edad. Asimismo, cuando se analizó el 25% de la supervivencia ésta indicó diferencias estadísticas [$F_{(3,12)} = 137.41$, $P < 0.001$] con el grupo de ratones NTg (s) con una esperanza del 25% alcanzada a los 27 meses de edad y significativamente diferente a la alcanzada por los otros grupos y hay diferencias entre cada uno de ellos tal como se ilustra en la figura 32.

De forma general, el curso temporal de la supervivencia desde los 12 meses hasta los 16 meses (que es cuando se finalizó la administración del tratamiento con risperidona) mostró diferencias en el tiempo. Así, el análisis de medidas repetidas MANOVA 2x2x5 indicó un efecto en el 'tiempo/meses' [$F_{(4,168)} = 4388.1$, $P < 0.001$], mostró efecto 'tiempo x genotipo' [$F_{(4,168)} = 4.058$, $P < 0.01$], 'tiempo x tratamiento' [$F_{(4,168)} = 8.467$, $P < 0.001$] e interacción 'tiempo x genotipo x tratamiento' [$F_{(4,168)} = 10.01$, $P < 0.001$].

Asimismo, se analizó el curso temporal desde los 12 meses hasta los 21 meses de edad que es la edad en la que se considera se inicia de la etapa vital de 'muy viejos' y es el último punto temporal donde se muestra todos los grupos experimentales tienen algún animal vivo. El análisis de medidas repetidas MANOVA 2x2x10 indicó un efecto en el 'tiempo/meses' [$F_{(9,225)} = 6164.9$, $P < 0.001$], mostró efecto 'tiempo x genotipo' [$F_{(9,225)} = 2.268$, $P < 0.05$], 'tiempo x tratamiento' [$F_{(9,225)} = 15.144$, $P < 0.001$] e interacción 'tiempo x genotipo x tratamiento' [$F_{(9,225)} = 2.268$, $P < 0.05$].

Cuando los datos de supervivencia se analizan utilizando el test de Kaplan-Meier los resultados que se obtienen son los siguientes:

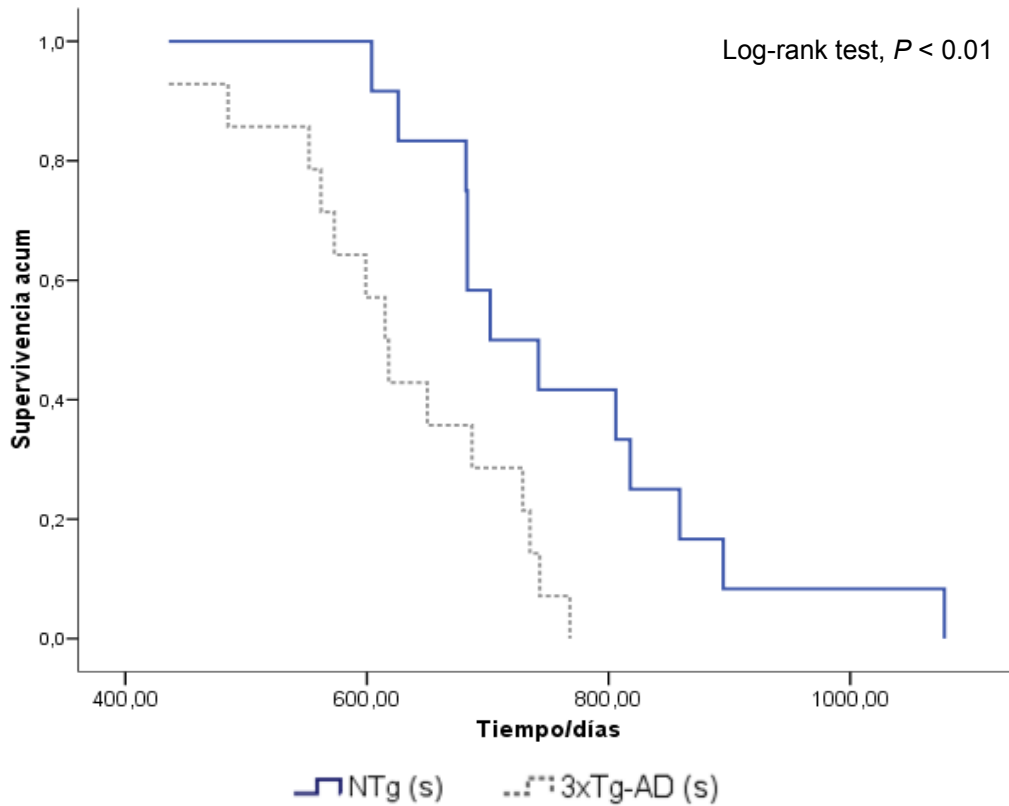


Figura 33. Curva de supervivencia en función de la edad de los animales (en días). Cada línea representa la supervivencia acumulada de los animales de cada grupo experimental [NTg (s) y 3xTg-AD (s)] Log-rank test $P < 0.001$.

La Figura 33 ilustra las curvas de supervivencias de los animales 3xTg-AD (s) vs. NTg (s) que permiten inferir las diferencias debidas al genotipo. Los valores de supervivencia media fueron inferiores en los ratones 3xTg-AD (s) con respecto al grupo NTg (s) y en consecuencia el test de Kaplan-Meier mostró diferencias significativas en la variables 'supervivencia' [con un Log rank= 7.218, gl 1, $P < 0.01$].

Curva de supervivencia

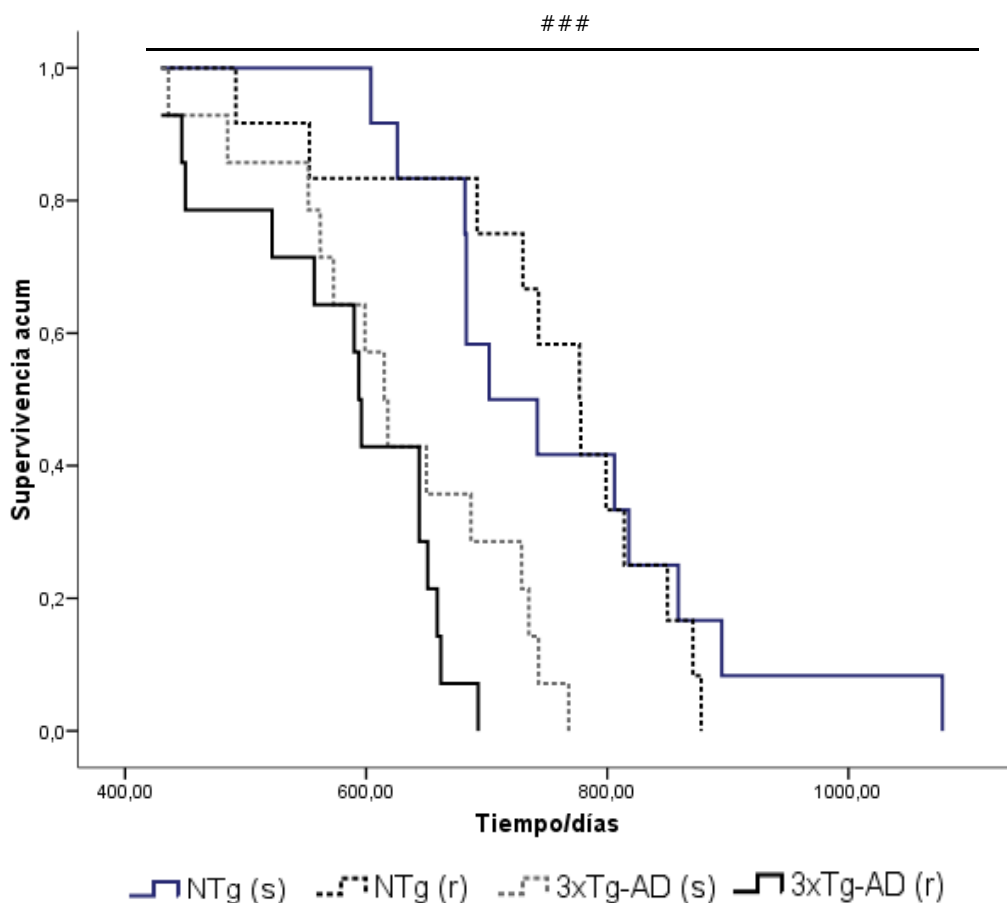


Figura 34. Curva de supervivencia en función de la edad de los animales (en días). Cada línea representa la supervivencia acumulada de los animales de cada grupo experimental [NTg (s), NTg (r), 3xTg-AD (s) y 3xTg-AD (r)]. Log-rank- test ### $P < 0.001$.

La Figura 34 muestra las curvas de supervivencia de todos los grupos estudiados, 3xTg-AD y NTg a los que se les administró solución salina o risperidona, desde el inicio del experimento hasta el último día de vida de los animales. Los valores de supervivencia media fueron significativamente distintos entre los cuatro grupos experimentales tal como indicó el test de Kaplan-Meier con un Log rank= 22.833, gl 1, $P < 0.001$.

Discusión

El estudio 3 tuvo por principal objetivo modelar en los ratones 3xTg-AD la vulnerabilidad que conlleva muerte inducida por la administración crónica del antipsicótico atípico risperidona en pacientes con la EA. Se trata del primer estudio que se plantea este objetivo a pesar de la imperiosa necesidad de tener un modelado animal que permita abordar esta vulnerabilidad que en estudios clínicos no es posible.

En la primera parte del estudio 3, la batería de pruebas conductuales nos permitió *caracterizar el fenotipo de los animales* y verificar la existencia de deficiencias cognitivas y de tipo SCPD. En la EA, los tratamientos con antipsicóticos atípicos son eficaces en el control de la ira, la agitación, la agresividad y los síntomas más propios del espectro psicótico como alucinaciones, paranoias y delirios, mientras que los síntomas cognitivos, la calidad de vida y atención no mejoran con dichos tratamientos (Kálmán, *et al.*, 2008). De cara a la acción farmacológica del antipsicótico es por tanto interesante destacar que los animales antes del tratamiento presentaban un incremento de la conducta estereotipada de enterramiento de mármoles (usada habitualmente para valorar la eficacia de antipsicóticos) y alteraciones de la conducta social (modificable con antipsicóticos).

En esta segunda parte del estudio 3, evaluamos primeramente la respuesta de los ratones 3xTg-AD ante el tratamiento crónico con risperidona y la comparamos también con la obtenida antes del tratamiento. Mientras que en la primera parte de resultados presentados (Estudio 3, *Caracterización del fenotipo basal*) hemos descrito el perfil conductual obtenido con la batería completa que pudo ser realizada en todos los animales, en este segundo bloque de resultados (Estudio 3. *Vulnerabilidad inducida por el antipsicótico risperidona*) nos centramos en las conductas que fueron usadas para valorar los efectos del antipsicótico y sobre todo, en el punto de interés principal de este estudio que es comprobar si podíamos validar el modelo para la vulnerabilidad que conlleva muerte inducida por la risperidona.

La risperidona fue utilizada en una dosis de 0.1 mg/kg equivalente a las administradas en pacientes con la enfermedad de Alzheimer y usada en la mayoría de los trabajos experimentales realizados en roedores. Como en los casos de pacientes geriátricos, la pauta de tratamiento se inició con una dosis inferior de 0.05 mg/kg.

En el estudio se planteó un diseño experimental longitudinal dividido en fases sucesivas para caracterizar el fenotipo basal (fase 1), empezar la administración del fármaco y realizar las primeras pruebas conductuales de seguimiento (fase 2) antes de estudiar los efectos de la dosis de 0.1 mg/kg de risperidona (fase 3) y completar un periodo total de tratamiento s.c. de 3 meses (fase 4). A partir de ese momento y hasta el fin de sus días, las variables de peso y supervivencia fueron registradas de forma continua con una cadencia semanal o diaria, respectivamente (fase 5).

En este estudio longitudinal, la *caracterización basal* se realizó a los 12 meses de edad y la administración del tratamiento se inició a los 13 meses, que en ambos casos se corresponde con estadios neuropatológicos avanzados de la enfermedad. La n de animales utilizados ($n=12-14$ para cada grupo) fue la adecuada para los estudios conductuales según las propias directrices sobre el uso de animales mutados genéticamente y teniendo en cuenta que a mediana edad aumenta la variabilidad individual debida a la edad. Sin embargo, para el estudio de curvas de supervivencia a largo plazo hubiese sido recomendable usar una n mucho mayor, entre 40 y 50 animales, aunque éste y otros trabajos de la literatura se ven limitados experimentalmente a usar n más reducidas por la dificultad de obtención de los sujetos experimentales.

A continuación procederemos a la discusión general de los resultados presentados en esta segunda parte del estudio 3 que engloba de forma directa a los que ya hemos discutido anteriormente en la primera parte intentado evitar la reiteración.

Test de las esquinas

En el modelado de los efectos conductuales inducidos por el antipsicótico atípico risperidona, se evaluó la conducta de neofobia mediante la prueba de las esquinas. Al inicio del tratamiento los ratones 3xTg-AD manifestaron una mayor inhibición conductual ante la novedad, presentando niveles superiores de neofobia con respecto a los ratones NTg, en las tres variables del test. A pesar de que esta respuesta fue independiente del tratamiento, se observó que en los ratones NTg(r) la dosis de 0.05 mg/kg de risperidona indujo un aumento significativo de la actividad vertical con respecto a los otros tres grupos experimentales. En la siguiente semana (semana 8, dosis de 0.1 mg/kg) se observó una atenuación de las diferencias entre genotipos, ahora solo detectables en la variable de levantamientos. De hecho, de forma general, durante el resto de las semanas, la conducta vertical resultó ser la más sensible para indicar los efectos de los factores estudiados. De forma reiterada, el factor predominante fue el de genotipo, corroborando la neofobia descrita en nuestro laboratorio en los ratones 3xTg-AD (Giménez-Llort *et al.*, 2007, 2008 y 2010) y en algunos pocos casos se observó efecto tratamiento. Por tanto, el tratamiento crónico con risperidona no modificó la respuesta neofóbica de los ratones 3xTg-AD y si algún efecto tuvo, fue esporádicamente en los animales NTg.

Prueba del campo abierto

De forma paralela a la neofobia en el corner test, en la prueba del campo abierto para valorar actividad exploratoria y ansiedad, se observaron también diferencias de genotipo con reducción de la actividad vertical y horizontal, retraso temporal de la conducta de acicalamiento y mayor presencia de orina. Este efecto predominante del factor genotipo corrobora los resultados obtenidos en el campo abierto en la fase previa al tratamiento (ya discutidas en la primer parte del estudio 3) y los corner tests. Las variables de actividad, tanto horizontal como vertical, mostraron además efecto del tratamiento *per se* y sus efectos se vieron influenciados por la interacción con el genotipo. Así, la mayor parte de los efectos de la risperidona se observaron nuevamente en los

animales NTg (r) a modo de aumento con respecto a los otros tres grupos experimentales. Este parece ser un patrón similar al observado en el test de las esquinas, pero en ambos vectores de la actividad locomotora, siendo el grupo NTg (r) distinto de todos los demás.

Cuando se comparan los datos a nivel longitudinal se aprecia que, de forma general, en la fase de tratamiento hay una atenuación de todas las respuestas que podría ser debida por el simple hecho de la repetición del test y/o la manipulación repetida a modo de *handling*. Estas son unas de las limitaciones propias del uso de baterías conductuales y se ven acentuadas en los estudios longitudinales y con los tratamientos crónicos. Son limitaciones difícilmente evitables pero que pueden ser mitigadas con la reducción del número de pruebas y la utilización de pruebas con variables con validez convergente, tal como hemos hecho en nuestro estudio, y la selección de pautas de administración oral o por bombas subcutáneas.

La risperidona acentúa las diferencias pero lo hace de forma distinta según el genotipo. Es interesante aquí resaltar que, a pesar de que las diferencias entre los dos grupos de animales NTg pre-existentes al uso de fármacos pueden estar potenciando este contraste de los ratones NTg (r), hemos verificado que es justamente este grupo y no el que será tratado con salino el que muestra los valores más estándar descritos para los animales machos NTg de nuestras colonias. Por tanto, en todo caso, el resultado de los ratones NTg tratados con salino está sesgado a la baja.

La persistencia del efecto genotipo de forma convergente entre estas dos pruebas, la del test de las esquinas y el campo abierto, que valoran aspectos emocionales y de tipo ansioso corrobora estudios previos con este modelo animal donde hemos descrito un incremento de la conducta emotiva, la neofobia y la ansiedad, desde etapas iniciales a las avanzadas de la enfermedad (Giménez-Llort *et al.*, 2006, 2007, 2008, 2010, García *et al.*, 2010, García-Mesa *et al.*, 2011, 2012). Por ejemplo, en hembras 3xTg-AD de 12 meses de edad se observó un aumento de la conducta de congelación, una disminución de la actividad horizontal, una tendencia de la reducción de la

actividad vertical y un incremento de la presencia de orina con respecto a su grupo control NTg (Giménez-Llort *et al.*, 2007). Estas diferencias también se han observado en ratones 3xTg-AD machos de 15 meses de edad (Giménez-Llort *et al.*, 2008).

En lo que se refiere al efecto de la risperidona, estudios con otros modelos de ratones para otras patologías, como el ratón ICR, han encontrado que una dosis baja de risperidona (0.01 mg/kg, *i.p.*) disminuye la conducta de congelación o 'freezing' y a dosis altas (0.04 mg/kg, *i.p.*) se reduce la actividad motora espontánea. Sin embargo, co-administrada con otros fármacos pierde efectividad en su efecto ansiolítico (Miyamoto *et al.*, 2004). En ratones ddY machos de 5 semanas de edad la risperidona a dosis 0.1 mg/kg inhibe la hiperlocomoción inducida por la metanfetamina y a varias otras dosis atenúa la inducida por MK-801 a través del bloqueo del receptor 5-HT_{2A/2C} (Uchida *et al.*, 2009). En ratones BTBR a dosis de 0.125 y 0.25 mg/kg *i.p.* la risperidona disminuye la actividad exploratoria (distancia total recorrida) en la prueba de campo abierto (Silverman *et al.*, 2010). En su conjunto, los datos confirman la acción dopaminérgica del fármaco modulando funciones motoras y de motivación (Rinaldi *et al.*, 2007) y ejerciendo propiedades ansiolíticas.

Por otro lado, la literatura sugiere también que los antipsicóticos atípicos como la risperidona podrían ser útiles para atenuar las conductas estereotipadas y no solo la actividad locomotora. En el campo abierto, la conducta de acicalamiento mostró también efectos de genotipo y de interacción genotipo por tratamiento. El acicalamiento, es una actividad de la vida diaria de los animales vinculada a la higiene, pero forma parte también de las estrategias conductuales de control del estrés (*copying with stress strategies*, en inglés), se puede desarrollar como conducta estereotipada y se ve modificada fácilmente en situaciones ansiosas (Kalueff, 2004 a,b). Además, el acicalamiento se utiliza a nivel experimental como herramienta para medir estimulación conductual de receptores D1 (Rimondini *et al.*, 1998) por lo que la risperidona, en lo que se refiere a su acción antagonista D1, podría inducir una disminución de esta conducta.

En los ratones 3xTg-AD se observó que la conducta de acicalamiento aparecía de forma más tardía en el tiempo con respecto a su control NTg de la misma edad, corroborando así las diferencias genotípicas en el perfil ansioso de estos animales descrito en nuestro laboratorio (Giménez-Llort *et al.*, 2007). En estos estudios previos con ratones machos y hembras 3xTg-AD viejos, la conducta de acicalamiento aparece más tarde que en los ratones NTg y a su vez, en aquellos, el envejecimiento reduce la duración (Giménez-Llort *et al.*, 2008). En cuanto al efecto del tratamiento, los efectos de interacción con el genotipo son debidos a una conducta de acicalamiento más frecuente en el grupo de ratones NTg (r) aunque esta diferencia selectiva replica la ya existente antes del tratamiento. De hecho, trabajos en cepas de ratones estándar como los ratones Swiss albinos indican que la risperidona, a dosis de 0.1 mg/Kg y 0.2 mg/Kg, disminuye el número de acicalamientos (Oliveira *et al.*, 2008). De igual modo, en el modelo de ratón BTBR para el autismo, también han observado que las dosis de 0.125 y 0.25 mg/kg *i.p.* reducen el acicalamiento entre un 40 y un 50% con respecto a su control, aunque la reducción de la conducta puede confundirse con niveles de sedación (Silverman *et al.*, 2010).

Laberinto en T

La batería de test incluyó el paradigma de alternancia espontánea en el laberinto en T que es una prueba utilizada mayoritariamente para evaluar memoria de trabajo y que incluye también aspectos cognitivos interesantes como la actividad exploratoria y la emotividad/ansiedad. Se trata de una prueba basada en la posibilidad de que el roedor elija uno de los brazos dispuestos en forma de T que limitan con un tercero. Muchas áreas cerebrales como el hipocampo, el septo, la corteza prefrontal (PFC) y el prosencéfalo basal y varios neurotransmisores como la dopamina y la norepinefrina se encuentran involucradas en la memoria de trabajo implícita en la realización de la prueba (Zhang, *et al.*, 2004; Deacon, *et al.*, 2006). Variables como la latencia en cruzar la intersección del laberinto permiten, además, valorar las estrategias de control de estrés de los animales, siendo ésta una variable que correlaciona con una

peor función neuroinmunoendocrina, indicadores de envejecimiento acelerado en ratones y muerte prematura (Guayerbas *et al.*, 2001). En nuestro estudio no se observaron diferencias en el número de errores de ejecución pero la eficiencia para completar las distintas fases del test estaba disminuida en los ratones 3xTg-AD y afectada ligeramente por la risperidona. Así, en la fase 2 del estudio los efectos de genotipo se observaron en la emotividad a modo de incremento de la presencia de orina con respecto a los grupos NTg y posteriormente, en la fase 3, las variables latencia de intersección y tiempo en completar el laberinto denotaron las deficiencias de los 3xTg-AD. Los efectos del tratamiento, solo se observaron en la fase 2, en la que los grupos tratados con risperidona a una dosis de 0.05 mg/kg necesitaron más tiempo para completar la exploración del laberinto con respecto a los grupos que recibieron salino. Además, en los ratones 3xTg-AD (r) el tiempo para completar el laberinto fue también superior comparado con el que necesitaron en la fase sin tratamiento. Los efectos de la interacción entre genotipo y tratamiento se observaron con fase 3 a nivel de emotividad tanto en defecaciones como en orina.

En nuestros estudios previos hemos observado que la latencia de intersección es una variable que refleja cambios y posteriores deficiencias en las estrategias del manejo del estrés de los animales y está relacionado con el deterioro de la homeostasis del sistema neuroinmunoendocrino, debido a la propia edad y, sobretudo, a la presencia de los transgenes (Giménez-Llort *et al.*, 2010, 2012). En ratones 3xTg-AD hembras de 6 meses de edad estos cambios se reflejan a modo de una mayor rapidez para llegar a la intersección del laberinto en T con respecto a los controles en una conducta típica de huida, mientras que en edades más tardías la estrategia *figth-or-flight* elegida para combatir la situación estresante aguda es la de la petrificación (Giménez-Llort *et al.*, 2010, 2012). Estas observaciones concuerdan con las del laboratorio de referencia que describió esta relación funcional en un estudio longitudinal con ratones OF-1 Swiss hembras. El grupo de Mónica de la Fuente demostró que los animales que emplean mayor tiempo en el laberinto en T muestran altos niveles de

emotividad/ansiedad y tienen un sistema inmunológico menos competente con respecto a los que exploran con mayor rapidez. Además, los animales que presentaban un menor rendimiento en el laberinto en T mostraron una reducción de la supervivencia en comparación con los que obtuvieron mejores resultados (Guayerbas, *et al.*, 2001).

La disminución de la alternancia espontánea en el laberinto en T se ha observado también en otros modelos transgénicos para la EA como el Tg2576 (Lalonde *et al.*, 2003) y el APP/PS1 (Tempier, 2009), en modelos animales para la esquizofrenia como los ratones STOP-null (Delotterie *et al.*, 2010) o farmacológicos por bloqueo selectivo de los receptores de la dopamina D₁ y D₂ en la región prelímbica de la PFC (Rinaldi, *et al.*, 2007). Los efectos de los antipsicóticos discrepan en función del modelo, el fármaco y la duración del tratamiento. Así, mientras en los ratones APP/PS1 el tratamiento crónico con quetiapina durante 7 y/o 10 meses normalizó la conducta de ansiedad observada en el laberinto, minimizó el deterioro de la memoria y la disminución de placas β A en el cerebro, en los ratones STOP-null el tratamiento con risperidona solo mostró una tendencia a reducir la alternancia espontánea en el laberinto Y (Delotterie *et al.*, 2010). Otros trabajos en el laberinto radial han demostrado efectos beneficiosos de la olanzapina y la clozapina en el deterioro de la memoria de los ratones machos BALB/c, aunque no están exentos de algunos efectos extrapiramidales (Mutlu, *et al.*, 2012).

De forma conjunta con las pruebas anteriores del test de las esquinas y el campo abierto, los resultados en el laberinto en T aportaron mayormente nuevos elementos de juicio para confirmar el perfil emotivo/ansioso de los ratones 3xTg-AD y su peor capacidad para afrontar el estrés, pero no indicaron problemas en la memoria de trabajo. El tratamiento crónico con risperidona, en todo caso empeoró este perfil y la eficiencia exploratoria de los animales NTg, probablemente debido a los efectos extrapiramidales, aunque por tratarse de un antipsicótico atípico y a dosis bajas, se considere que éstos son mucho menores que en otros antipsicóticos clásicos.

Laberinto acuático de Morris

Para evaluar el aprendizaje y memoria a corto y largo plazo en los grupos de ratones 3xTg-AD se utilizó el laberinto acuático de Morris (Morris, *et al.*, 1984). Todos los grupos mostraron la misma curva de adquisición ya sea en el análisis 'ensayo por ensayo' como en la de 'día por día' para el aprendizaje y memoria de corto plazo y largo plazo, respectivamente. Igualmente, en la prueba de 'retirada' todos los grupos distinguieron el cuadrante de la plataforma respecto a los otros cuadrantes, aunque el tratamiento con risperidona disminuyó la búsqueda selectiva de la plataforma incorporando a uno de los cuadrantes adyacentes en la preferencia. La interacción entre genotipo y tratamiento en las preferencias de los dos cuadrantes adyacentes indicó que los efectos de la risperidona afectan de forma distinta a los dos genotipos, aunque de forma general éstos y los otros datos no indican deficiencias *per se* sino más bien cambios de estrategias de búsqueda. Así, como en el caso de la memoria de trabajo, la risperidona no afectó de forma determinante los resultados ya que los animales continuaron distinguiendo la que había sido la posición de la plataforma. También cabe señalar que la paridad en los resultados de este test está seguramente condicionada por el hecho del conocimiento previo de los paradigmas ya que las diferencias de genotipo que se observaron en la primera experiencia en el laberinto acuático ya no existen entre los grupos salinos. Las latencias de encuentro de la plataforma en los primeros ensayos son muy bajas, equivalentes al tercer día de test antes del tratamiento, apoyando esta interpretación.

En algunos casos, en este modelo de ratón se ha observado también que los tratamientos, según sus acciones farmacológicas, afectan de forma selectiva distintos aspectos del proceso de aprendizaje y memoria. Este es el caso del estudio con ratones 3xTg-AD de 10 meses de edad en ambos géneros, donde se encontró que el tratamiento crónico de 5 meses con paroxetina mejoró el déficit de la navegación espacial tanto en machos como en hembras, sin afectar la velocidad de nado o la distancia recorrida, lo que sugiere una conservación de las funciones cognitivas (Nelson *et al.*, 2007). Asimismo, estudios con

ratones 3xTg-AD machos de 12 meses de edad tratados con melatonina encontraron que el tratamiento mejoraba la retención del aprendizaje de la posición de la plataforma (García-Mesa *et al.*, 2012). En ratones APP/PS1 tratados con quetiapina la administración continua de 4 a 7 meses del antipsicótico disminuyó el número de placas de β A en el cortex y en el hipocampo de los animales y redujo la pérdida de la memoria, atenuando también la conducta de ansiedad (He *et al.*, 2009). Por otro lado, se ha descrito que la olanzapina no afecta los procesos de adquisición, consolidación o recuperación en la prueba del MWM (Hou *et al.*, 2006). No obstante, el mismo trabajo muestra que la clozapina y el haloperidol parecieron afectar el proceso de adquisición, consolidación e indujeron un deterioro en el aprendizaje espacial (Hou, *et al.*, 2006).

De hecho, los efectos de los antipsicóticos sobre el aprendizaje y la memoria en procesos que cursan propiamente con psicosis son controversidos, ya que hay estudios en ratas que han indicado que el antipsicótico clásico haloperidol y el antipsicótico atípico risperidona, a determinadas dosis, afectan procesos cognitivos (Didriksen, *et al.*, 2007), mientras que la clozapina y sertindol presentaron eficacia en el tratamiento de la psicosis sin producir efectos perjudiciales sobre la cognición (Mutlu, *et al.*, 2011). Es más que probable que estas discrepancias en las acciones farmacológicas sean debidas a las diferencias que éstos presentan en el perfil de selectividad farmacológica por distintos sistemas de neurotransmisión como la dopamina y la serotonina. En el caso de la risperidona, clasificado como un agente antipsicótico 'cualitativamente atípico' con una incidencia relativamente baja de efectos extrapiramidales cuando se da a dosis bajas que tiene una acción antagonista serotoninérgica superior a la dopaminérgica.

Interacción social

En esta tesis doctoral la interacción social en ratones 3xTg-AD ha sido el punto de inicio de los trabajos experimentales, siendo evaluada de forma reiterada a lo largo de los diferentes estudios. El estudio 1 ha sido el que ha caracterizado,

por primera vez, las distintas conductas sociales y no-sociales en el modelo animal. Ha permitido seleccionar, de entre todos los otros test, a la 'interacción social' para ser incorporado en la batería del estudio 3 la interacción social como el tests más completo y sensible para evaluar los déficits de conducta social en los ratones 3xTg-AD en comparación con los ratones NTg de la misma edad y género. En la fase de caracterización basal de este estudio 3 hemos replicado de forma consistente los resultados obtenidos previamente pero, esta vez, evaluados dentro de una batería conductual. En esta segunda parte del estudio, se evaluó el efecto del tratamiento crónico con risperidona en estas conductas ya que los antipsicóticos atípicos se eligen a menudo para tratar los SCPD, como la psicosis, la agresividad y la agitación.

Los ratones 3xTg-AD mostraron resultados similares a los de los animales NTg en la conducta de interacción social más común como es la de contacto cara-cuerpo. Sin embargo, los efectos genotipo indicaron menor contacto anogenital, mayor cola vibrante y ausencia de agresividad en los grupos de ratones 3xTg-AD con respecto a los NTg. La risperidona ejerció efectos disminuyendo la conducta ano-genital y en el caso de los ratones 3xTg-AD corrigió de forma significativa la preponderancia de la conducta vibrante que en el estudio 1 hallamos como característica del patrón de interacción social en este modelo animal.

Los efectos de la risperidona interaccionaron con los del genotipo en unas y otras variables de todas las conductas sociales estudiadas, de tal modo que los efectos fueron más intensos en el genotipo NTg donde la risperidona disminuyó las conductas sociales llevándolas a niveles equivalentes a los que los grupos 3xTg-AD.

Entre las conductas no-sociales que aparecen intercaladas durante el desarrollo de la interacción social, los efectos del genotipo se observaron a modo de una disminución de la actividad exploratoria horizontal y vertical en los grupos de ratones 3xTg-AD con respecto a los grupos NTg. De hecho, la conducta de cola vibrante va asociada a una inmovilidad del animal, por lo que los niveles más altos de esta conducta en los 3xTg-AD justifican que la actividad exploratoria,

que ya de partida acostumbra a ser menor en estos animales, se vea reducida de forma significativa.

Los efectos de la risperidona fueron observados solamente en la variable número de enterramientos donde el fármaco disminuyó esta conducta indicadora de estereotipia de tipo psicótico o de ansiedad de tipo obsesivo-compulsivo (revisado en Fernández-Teruel *et al.*, 2005). La mejora en esta variable en ambos genotipos y la mejora también de la conducta de cola vibrante en los ratones 3xTg-AD sugieren que la risperidona ejerció principalmente un efecto antipsicótico/ansiolítico logrando modificar estos aspectos de los estados o rasgos ansiosos, en un y otro genotipo, respectivamente.

Así como en los resultados de los antipsicóticos atípicos en actividad exploratoria y emotividad la discusión científica en la literatura se desenvuelve en torno a sus acciones dopaminérgicas, de forma general, se considera que el tratamiento con risperidona podría modificar el patrón de la conducta social gracias a su perfil como antagonista 5-HT₂, ya que estos receptores serotoninérgicos han sido implicados en la conducta de interacción social (File *et al.*, 2003). En un estudio comparativo en ratones APP/London, el tratamiento con risperidona disminuyó su conducta agresiva y lo hizo de forma consistente a la ejercida por el 8-OH-DPAT y la buspirona, dos agonistas serotoninérgicos (Moechars *et al.*, 1998). En otros modelos para la EA, como el ratón APP23, el tratamiento con risperidona también atenúa la conducta agresiva de los animales (Vloeberghs *et al.*, 2008) mientras que en modelos de psicosis el deterioro de la interacción social inducido por PCP puede ser mejorada con el anticolinesterásico galantamina (0.3 mg/kg) y con 0.1 mg/kg de risperidona (Wang *et al.*, 2007). La risperidona también corrige la agresión inducida por aislamiento social en ratones ddY machos (Uchida *et al.*, 2009) y la conducta de ataque en ratones albinos machos aunque no está exenta de efectos secundarios a nivel de conducta motora (Rodríguez-Arias *et al.*, 1998). En nuestro modelo animal, hemos observado aumento espontáneo, pero sobretodo inducido (por aislamiento) de la agresividad en los ratones 3xTg-AD (Giménez-

Llort *et al.*, 2010b). Sin embargo, en este estudio, la presencia de esta conducta en los ratones es muy baja o nula, ya que se trata de agresividad espontánea y no inducida/potenciada por aislamiento (los animales parten de una condición social diaria). Aún así, la agresividad observada en los ratones NTg (s) se ve corregida en el grupo tratado con risperidona NTg (r). En el caso de los ratones 3xTg-AD, es probable que la conducta de 'cola vibrante' actúe a modo de mecanismo disipador que permite atenuar temporalmente la respuesta de agresividad dirigida, con lo no se observa 'agresividad'.

Enterramiento de mármoles

La prueba de enterramiento de mármoles, que hoy en día se utiliza para la detección de nuevos antidepresivos, ansiolíticos y antipsicóticos (Njung'e *et al.*, 1991; Bruins *et al.*, 2008 y Kaurav *et al.*, 2012) se ha caracterizado por primera vez en ratones 3xTg-AD en este estudio 3. Los patrones de respuesta fueron claramente distintos, ya que el nivel de interacción de los ratones NTg con los mármoles resulta en un escenario donde la mitad de los objetos han sido cambiados de posición mientras que las otras dos cuartas partes permanecen intactas o han sido enterradas. En los ratones 3xTg-AD la conducta de enterramiento está acentuada de manera que más de la mitad de los objetos aparecen enterrados al final del test, una cuarta parte está cambiada de posición y solo el 10% restante permanece intacto.

En la segunda parte del estudio 3, la conducta de enterramiento de mármoles se estudió de nuevo para evaluar el efecto del antipsicótico. Sin embargo, resulta interesante observar previamente, en los resultados de los grupos tratados con salino, que el patrón conductual descrito anteriormente para uno y otro genotipo ha sido modificado de forma significativa por el protocolo de manipulación crónica. En los ratones NTg aumentó la interacción con los objetos, potenciándose el entierro de los mármoles, que ahora son cuantitativamente equivalentes a los mármoles cambiados de posición. Por el contrario, en los ratones 3xTg-AD el tratamiento crónico con salino redujo la interacción con los objetos, disminuyendo significativamente el número de

mármoles enterrados a favor de los mármoles cambiados de posición. En su conjunto, estos efectos reducen las diferencias de genotipo.

Cuando se evalúan todos los factores de forma conjunta, se ratifica la observación de la ausencia de efecto genotipo. La risperidona aumentó el número de mármoles intactos y disminuyó el número de mármoles enterrados con respecto a los grupos administrados con solución salina, por lo que, de forma general, la risperidona reduce la interacción con los objetos.

Estos resultados corroboran los observados en la conducta de enterramiento durante las pruebas de interacción social de este estudio 3. De forma convergente, se encontraron también diferencias entre genotipos con mayor conducta de enterramiento en los ratones 3xTg-AD, las diferencias de genotipo desaparecieron cuando se estudiaron durante el tratamiento y la risperidona disminuyó la conducta de enterramiento en los dos grupos. Aunque la conducta de enterramiento que se evalúa durante la prueba de interacción social no es conducta respecto a ningún objeto, la conducta es similar a la que se mide, de forma más dirigida, en el test de enterramiento de mármoles.

Investigaciones con otros modelos de ratones como ICR machos tratados con risperidona a una dosis de 1 mg/kg, *p.o.* han observado que el tratamiento con risperidona es eficaz en la disminución del número de mármoles enterrados aunque reduce la actividad locomotora (Matsushita, *et al.*, 2005). Este efecto se muestra también en ratones BTBR machos (Gould, *et al.*, 2011) y en ratones NIH swiss machos (Li, *et al.*, 2006). Asimismo, en ratones NMRI machos la risperidona, a dosis de 0.16 – 0.63 mg/kg, reduce significativamente tanto la conducta de enterramientos de mármoles como la actividad locomotora, lo que sugiere que la acción antagonista del receptor 5-HT_{2A} del fármaco puede contribuir a la eficacia del enterramiento de los mármoles y tener efecto ansiolítico (Bruins, *et al.*, 2008). De acuerdo con estos resultados, se puede decir que la risperidona, a una dosis baja sin efecto cataléptico, puede disminuir el número de mármoles de forma eficaz (Bardin, *et al.*, 2006).

Niveles basales de glucosa plasmática

Los fármacos antipsicóticos pueden provocar una serie de problemas metabólicos, como el aumento de peso, la hiperglucemia, anomalías en los lípidos y el desarrollo de diabetes tipo 2. Dada esta grave amenaza para la salud, la FDA solicitó que las etiquetas de los antipsicóticos de segunda generación como la clozapina, olanzapina, risperidona, quetiapina, ziprasidona y aripiprazol deberían indicar que aumentan el riesgo de desarrollar diabetes (Cope *et al.*, 2009 y Savoy *et al.*, 2010). En el caso del aumento de la vulnerabilidad que conlleva incremento de mortalidad en la EA inducida por antipsicóticos atípicos, el síndrome metabólico ha sido hipotetizado inicialmente como uno de los posibles factores de riesgo. Los antipsicóticos se unen con alta afinidad a una amplia variedad de receptores de neurotransmisores y transportadores que podrían estar implicados en los diversos efectos metabólicos, sin embargo, los mecanismos subyacentes no están del todo esclarecidos.

En el estudio 3 se decidió evaluar los niveles basales de glucosa en ayuno así como la tolerancia y repetir la medición de los niveles basales de glucosa. Esta vez sin ayuno, después del tratamiento crónico con risperidona. Tal como se mencionó en el apartado de materiales y métodos, durante la segunda parte del estudio 3 se obvió el test de tolerancia a la glucosa porque ésta implica además del ayuno en los animales añadido al ayuno normal en la fase de luz y la consecuente pérdida de peso que, a estas edades, podía afectar a las curvas de supervivencia de los animales.

Como en la fase de caracterización basal, durante la fase de tratamiento no se observaron diferencias de genotipo pero sí efectos de interacción genotipo por tratamiento. Estos efectos resultaron, sin embargo, de una disminución significativa de los niveles de glucosa en los ratones NTg (r) en comparación con los de los animales NTg (s) o cuando los valores de glucemia de los NTg (r) se compararon longitudinalmente con los obtenidos antes del tratamiento. Los resultados concuerdan también con estudios realizados en nuestro laboratorio con animales 3xTg-AD a 6 meses de edad en los que observamos, en ambos géneros, que los niveles basales de glucosa plasmática con y sin ayuno son

normales siendo la homeostasis de la glucosa la que se ve comprometida en los ratones 3xTg-AD aunque con el envejecimiento las diferencias de genotipo igualan los resultados (Giménez-Llort *et al.*, 2010). Estudios en ratones C57BL/6 machos administrados con risperidona mostraron un ligero incremento de los niveles de glucosa en la sangre, pero sólo a una dosis baja del fármaco (Dwyer *et al.*, 2003) mientras que otros trabajos más recientes, con ratones FVB/N machos, observan una reducción significativa de la glucosa en plasma (-30 %) a través de la inducción de la liberación de insulina (Savoy, *et al.*, 2010).

Peso corporal

Hoy en día los resultados sobre el peso en pacientes con EA tratados con antipsicóticos son un tanto contradictorios ya que hay estudios que indican que la administración de risperidona, olanzapina o quetiapina a dosis bajas no se encuentran asociadas con la ganancia de peso (Rondanelli *et al.*, 2006). Sin embargo, otras investigaciones indican que el uso de olanzapina y quetiapina aumentan de forma significativa el peso en la mujeres y modifican los niveles de colesterol (Zheng., *et al.*, 2009). A nivel experimental, las medidas de peso son un buen indicador del estado de salud del animal. Además, en este estudio 3, permiten evaluar el posible efecto del tratamiento crónico con risperidona en esta variable, a parte de ser condición *sin equanum* para administrar la dosis correcta del tratamiento.

Por estas razones, se decidió hacer un seguimiento longitudinal del peso desde el inicio del proceso experimental hasta el final de la vida de los ratones. De acuerdo con nuestros propios datos, se encontró mayor peso corporal en los ratones 3xTg-AD (Giménez-Llort *et al.*, 2007) y a medida que avanzaron en edad estas diferencias se fueron atenuando. La risperidona produjo una pérdida de peso solo en ratones 3xTg-AD, mientras que los grupos de ratones NTg mantuvieron su peso corporal. En los estadios finales de la vida del animal se observó una pérdida acusada de peso y éste, inmediatamente después de la defunción, se encontró disminuido en los cuatro grupos experimentales, aunque

el proceso de caquexia y la deshidratación intrínseca al proceso de muerte hace que los datos pierdan exactitud. Estudios previos con ratones 3xTg-AD de 6 meses de edad (machos y hembras) han observado una disminución en la curva de peso solo en el grupo de hembras en situaciones potencialmente estresantes, esto podría ser a que son más sensibles a la manipulación repetida o a la exposición de pruebas conductuales, no obstante no se puede afirmar en qué medida la pérdida de peso puede estar asociada con la reactividad emocional.

Diversos estudios creen que la reducción del peso puede estar asociada a la disminución de la actividad, pero dependiendo de las dosis administradas. Algunos autores han demostrado una relación de los efectos neurolépticos de la olanzapina, la ziprasidona y la risperidona con la disminución de la ingesta de alimentos, la reducción de la masa corporal y la actividad motora ya que estos cambios están solo presentes en ratones wild-type pero no en ratones D2R knockout (Yoon *et al.*, 2010). No obstante, el tratamiento con risperidona 4 mg/kg *p.o* en ratones C57BL/6J hembras de 12 semanas de edad induce un aumento del consumo de alimentos, el correspondiente aumento de peso, aumento de la temperatura corporal durante la fase de luz y una reducción de la actividad durante la fase de oscuridad (Cope *et al.*, 2009).

Esperanza de vida y supervivencia

El tratamiento con antipsicóticos atípicos pueden duplicar el riesgo de mortalidad en los pacientes de edad avanzada con demencia, aunque este riesgo es similar o incluso inferior al de los antipsicóticos convencionales. El incremento del riesgo es más elevado al inicio del tratamiento antipsicótico y no parece estar relacionado ni con la dosis, ni con el tipo de sustancia (Vilalta-Franch, *et al.*, 2008). Recientes estudios han indicado que pacientes con demencia a los que se les prescribió antipsicóticos como tioridazina, clorpromazina, haloperidol, trifluoperazina y risperidona para tratar los síntomas neuropsiquiátricos aumentaron el riesgo de mortalidad a largo plazo. La diferencia más pronunciada se ubicó entre los 24 y 36 meses después del inicio

del tratamiento (Ballard *et al.*, 2009; Kales *et al.*, 2012). Además, en otro tipo de patologías como el trastorno bipolar en pacientes ancianos, la risperidona tiene asociada mayor incidencia de mortalidad comparado con la quetiapina (Bhalerao, *et al.*, 2012).

Nuestro estudio longitudinal replica el incremento de mortalidad descrito por nuestro laboratorio en ratones 3xTg-AD y demuestra que este modelo animal es capaz de modelar la vulnerabilidad que conlleva incremento de la mortalidad inducida por la risperidona en humanos.

El grupo de ratones NTg (s) mantuvo su supervivencia intacta hasta los 19 meses de edad mientras que el inicio de la mortalidad fue a los 15 meses de edad para los grupos de ratones NTg (r), 3xTg-AD (s) y 3xTg-AD (r). En trabajos previos con machos 3xTg-AD y NTg de 15 meses de edad el incremento de mortalidad, evaluado de los 6 a los 15 meses de edad, fue del 40% mientras que en el presente estudio, a la misma edad, el porcentaje es del 15% por el hecho de estar evaluado desde los 12 meses y por tanto, las mortalidades ocurridas desde los 6 meses de edad no se contabilizan (Giménez-Llort *et al.*, 2008).

Las esperanzas de vida total, esperanza de vida media y esperanza de vida con supervivencia del 25% demostraron los efectos predominantes del genotipo, pero también el efecto de la risperidona en la supervivencia en el rango de edades por debajo de los que se establecen las esperanzas de vida media.

Por tanto, aunque las curvas de supervivencia en los ratones tratados con risperidona y solución salina, mostraron pendientes similares en los cuatro grupos experimentales, la vulnerabilidad inicial y a partir de la esperanza de vida media determinan cambios importantes en la supervivencia máxima registrada. En los ratones NTg este máximo se vió reducido 8 meses con el tratamiento de risperidona (de 36 meses a 28 meses) y en grupos de ratones 3xTg-AD la supervivencia máxima se redujo 2 meses (pasó de 24 meses a 22 meses). Los datos sugirien, además, que la risperidona ejerció efectos deleterios en los animales NTg que los igualaron en vulnerabilidad vital a los animales con genotipo 3xTg-AD. Este efecto deleterio de la risperidona en los

animales NTg fue principalmente observable entre los 15 y los 17 meses de edad, aunque volvió a aparecer en los rangos de edad que se corresponden con sus esperanzas de vida media (24 y 25 meses, respectivamente) para mantener la diferencia en supervivencia hasta el final de la curva.

Se puede concluir que el estudio 3 replicó, en los ratones 3xTg-AD, el aumento del riesgo de mortalidad observado a nivel clínico en humanos. Así, a pesar de que la risperidona permitió modificar las alteraciones en conducta social y la conducta de enterramiento de mármoles mostradas por los ratones 3xTg-AD, ejerció efectos negativos reduciendo la actividad exploratoria vertical y horizontal en los tests, y lo que es más relevante comprometió severamente la esperanza de vida del animal. De la misma manera, la risperidona ejerció efectos deleterios especialmente severos en los animales NTg en los animales viejos, modulando también, a nivel experimental, la ventana de vulnerabilidad temprana descrita para los efectos adversos de riesgo cerebrovascular (ACV) en ancianos tratados con antipsicóticos atípicos.

Conclusiones

Las conclusiones de la segunda parte del estudio 3 sobre los efectos de la administración crónica del antipsicótico atípico risperidona y el modelado de la vulnerabilidad que conlleva incremento de mortalidad en ratones 3xTg-AD y NTg fueron los siguientes:

1. En lo referente a la actividad exploratoria y el perfil emotivo/ansioso en las *pruebas de esquinas y el campo abierto*:
 - 1.1. La batería de pruebas de esquinas corroboró la neofobia característica de los ratones 3xTg-AD y los efectos debidos al tratamiento crónico con risperidona se manifestaron solamente en algunas ocasiones. En este test, el 'número de levantamientos' fue la variable más sensible para mostrar los efectos de los factores.

- 1.2. La prueba del campo abierto mostró también el perfil ansioso de los ratones 3xTg-AD y detectó efectos de tratamiento e interacción con el tratamiento en los componentes horizontal y vertical de la conducta locomotora. En este test, la 'distancia total recorrida' y el 'número total de levantamientos' fueron las variables más sensibles para mostrar los efectos de los factores.

2. En lo que se refiere a la alternancia *espontanea en el laberinto en T* se observó que:
 - 2.1. Los ratones 3xTg-AD presentaron mayor 'presencia de orina', 'latencias de intersección' y 'tiempo en completar el laberinto' que los grupos NTg indicativos de una mayor emotividad, peor capacidad de afrontamiento del estrés y peor eficiencia exploratoria, respectivamente.
 - 2.2. La dosis de 0.05 mg/kg de risperidona empeoró la ejecución de la tarea aumentando el 'tiempo necesario para completarla', independientemente del genotipo.
 - 2.3. El tratamiento crónico con risperidona 0.1 mg/kg aumentó la 'latencia de intersección' en la mayor parte de los grupos aunque el efecto solo alcanzó la significación en el grupo 3xTg-AD.

3. En lo referente a los efectos en el *aprendizaje y la memoria en el laberinto acuático de Morris* :

El laberinto acuático de Morris indicó que la curva de adquisición estaba optimizada en todos los grupos probablemente por la experiencia previa del test. Igualmente, la prueba de retirada de la plataforma mostró la capacidad de todos los grupos en discernir el cuadrante donde había estado localizada la plataforma y la risperidona disminuyó la selectividad de la búsqueda sin llegar a modificarla.

4. Respecto a los efectos de la risperidona en la *interacción social*:

- 4.1. Los ratones 3xTg-AD mostraron resultados similares a los de los animales NTg en la conducta de interacción social más común como es la de 'contacto cara-cuerpo', pero presentaron menor contacto 'anogenital', mayor presencia de 'cola vibrante' y no hubo 'agresividad' dirigida.
 - 4.2. La risperidona disminuyó la 'conducta ano-genital' y en el caso de los ratones 3xTg-AD corrigió de forma significativa la 'conducta vibrante'. Los efectos de la risperidona fueron más intensos en el genotipo NTg donde disminuyó las conductas sociales llevándolas a niveles equivalentes a los que los grupos 3xTg-AD.
 - 4.3. En las conductas no-sociales, los ratones 3xTg-AD presentaron menos 'actividad exploratoria horizontal' y 'vertical' con respecto a los grupos NTg y risperidona disminuyó el 'número de enterramientos'. En su conjunto, los datos sugieren un efecto principalmente ansiolítico de la risperidona.
5. En la *prueba de enterramiento de mármoles*:

La risperidona mostró su efectividad antipsicótica induciendo un incremento significativo en el número de mármoles intactos y una disminución en el de enterrados con respecto a los grupos a los que se les administró solución salina.
 6. En lo referente a los *niveles plasmáticos de glucosa basales*:

El estado basal de los niveles plasmáticos de glucosa solo mostró efectos de interacción genotipo por tratamiento de forma que la risperidona produjo una disminución de los niveles en los ratones NTg (r) con respecto a los otros grupos experimentales.
 7. Los efectos de la risperidona en los *pesos corporales*:

En la caracterización basal (primera parte del estudio) y en la fase de tratamiento con risperidona los ratones 3xTg-AD presentaron mayor peso corporal y estas diferencias se atenuaron con la edad. El inicio del tratamiento con una dosis 0.05 mg/kg de risperidona (Fase 2) conllevó una

disminución de peso independientemente del genotipo. La dosis de 0.1 mg/kg de risperidona (Fase 3) provocó una pérdida de peso de forma selectiva, solo en los grupos de ratones 3xTg-AD.

8. Sobre el modelado de la *vulnerabilidad inducida por risperidona que conlleva incremento de mortalidad*, las *curvas de supervivencia* mostraron que:

8.1. El grupo de ratones NTg (s) mantuvo su supervivencia intacta hasta los 19 meses de edad. Sin embargo, el inicio de la mortalidad de los otros tres grupos experimentales fue a los 15 meses de edad.

8.2. La esperanza de vida media de los ratones NTg (s) se ubicó a los 24 meses de edad, mientras que en los dos grupos de ratones 3xTg-AD se situó a los 18.

8.3. La supervivencia máxima observada fue la de los ratones NTg (s) con 36 meses de edad y difirió entre los grupos experimentales. El tratamiento crónico con risperidona redujo la supervivencia máxima de los ratones NTg pasando de 36 meses a 28 meses y en el grupo de ratones 3xTg-AD pasó de 24 meses a 22 meses.

8.4. Así, el estudio modela en los ratones 3xTg-AD la vulnerabilidad con incremento de mortalidad inducida por la risperidona en los pacientes con la EA y sus efectos del deterioro en los animales NTg modulan la ventana de vulnerabilidad temprana descrita para los efectos adversos de riesgo cerebrovascular (ACV) en ancianos tratados con antipsicóticos atípicos.

Aportaciones de la tesis y conclusiones generales

Aportaciones de la tesis y conclusiones generales

La enfermedad de Alzheimer, la forma más común de demencia entre las personas mayores, se caracteriza por la pérdida de las funciones cognitivas y déficits conductuales afectando, además, la capacidad del individuo para llevar a cabo las actividades de la vida diaria (Di Carlos *et al.*, 2012). Las alteraciones sociales exhibidas por los ratones 3xTg-AD pueden ser similares a los observados en pacientes, incluyendo alteraciones de las conductas interpersonales, interacción social inapropiada y deambulación (Hölttä EH., *et al.*, 2012; Pietropaolo, *et al.*, 2012). Hoy en día la detección de nuevos tratamientos para la enfermedad de Alzheimer se centra principalmente en los déficits cognitivos dejando relegados muchas veces los síntomas conductuales y psicológicos de las demencias y las disfunciones en las actividades de la vida diaria, a pesar de que son estos síntomas los causantes de la institucionalización temprana (Giménez-Llort, *et al.*, 2007).

Por este motivo los dos primeros estudios de esta tesis doctoral se orientaron a la caracterización del modelo animal triple-transgénico 3xTg-AD creado por el laboratorio de LaFerla (UCI, USA) en diversas *conductas sociales* y actividades de la vida diaria como la *conducta de nido* no caracterizadas hasta el momento. Se estudiaron animales de ambos géneros, en distintas fases de la enfermedad, y de forma comparativa con sus respectivos controles NTg. En la mayoría de las conductas sociales estudiadas se observan los efectos de los factores 'género', 'genotipo' y la interacción 'género x genotipo'. Así, aunque la *agregación social* durante la fase de sueño fue similar, el patrón de *interacción social* difirió de forma característica, según genotipo y género, en las variables relacionadas con la *conducta de cola vibrante* resultado que apareció de forma consistente también en el estudio 3 poniendo de manifiesto un aumento de la ansiedad de los animales. Entre las conductas no-sociales, la actividad horizontal y las conductas de acicalamiento y enterramiento fueron las que mostraron principalmente efecto género y genotipo, debido principalmente a los

patrones exhibidos por las hembras 3xTg-AD. Estas conductas se podrían asociar también a los síntomas de ansiedad, reducción de la actividad locomotora y una pérdida de interés, relacionados con la disminución de la conducta social y cognitiva en los pacientes con la EA (Dyck *et al.*, 2009; Cummings, 2000). El efecto *Dalila* o *barbering* sólo se observó en hembras NTg y no se encontró relacionada con la conducta evaluada en el *test de tubodominancia*. Por último, el estudio 2 demostró que la *conducta de anidación* se halló alterada tanto en las estructuras parentales como en animales aislados, pero estaba condicionada por aspectos metodológicos como el tipo de material para construirlo. Con el material de ‘papel de celulosa’ pero no con ‘algodón’ es posible observar diferencias de tipo genotipo como de edad o fases de la enfermedad en la construcción del nido, tanto en las estructuras parentales como en aislamiento social. Precisamente este hallazgo permite justificar las discrepancias en la literatura con respecto a los déficits de conducta de nido en modelos animales para la enfermedad de Alzheimer.

En general, éstos resultados sugieren que los ratones 3xTg-AD presentan deficiencias específicas tanto en las *conductas sociales* como en la de *la actividad de la vida diaria*, que hacen que este modelo animal y estas pruebas conductuales, en particular, sean útiles para desarrollar y evaluar, a nivel experimental, estrategias preventivas y terapéuticas beneficiosas para la enfermedad así como para evaluar factores de riesgo.

De esta manera, las caracterizaciones realizadas en los estudios 1 y 2 permitieron tomar decisiones sobre la incorporación de unas u otras pruebas conductuales en la batería conductual del estudio 3 sobre la vulnerabilidad inducida por antipsicóticos atípicos como la risperidona para la que la FDA ha implementando ciertas restricciones de uso en humanos ya que se ha descrito que conlleva un incremento de riesgo cerebrovascular en pacientes geriátricos y de mortalidad en pacientes con la enfermedad de Alzheimer (Schneider, *et*

al., 2005; Ballard, et al., 2006; Kales, et al., 2012). A nivel clínico, los antipsicóticos atípicos se utilizan para tratar los síntomas neuropsiquiátricos en personas con la enfermedad de Alzheimer, principalmente para disminuir las conductas de agitación, psicosis y desórdenes del estado de ánimo como la depresión, la ansiedad y la apatía. En su conjunto y de forma abreviada, podemos decir que la caracterización de los animales 3xTg-AD de este estudio 3 encontró alteraciones en aspectos cognitivos de aprendizaje y memoria a corto y largo plazo en el laberinto acuático de Morris pero no en memoria de trabajo. Los cambios en síntomas tipo SCPD se observaron como incremento de la neofobia y disminución de la actividad exploratoria del animal, conductas indicadoras de emotividad y ansiedad en varios tests, deficiencias en la interacción social y la conducta de enterramiento de mármoles, mientras que el estudio del ritmo circadiano solo replicó la disminución de actividad durante el ciclo nocturno 'activo' del *sundawning behavior* y la prueba de desesperanza aprendida parece que estaba condicionada por la impulsividad motriz. En actividades de la vida diaria, el acicalamiento mostró un perfil alterado más propio de su rol como conducta disipadora de la ansiedad. La tolerancia a la glucosa fue normal.

Una vez realizada la caracterización del perfil conductual de los ratones machos 3xTg-AD de 12 meses, que se corresponde con fases avanzadas de la enfermedad, y con respecto a controles NTg de la misma edad, se estudiaron los efectos de la risperidona como antipsicótico atípico. Nuestro objetivo principal fue modelar esta vulnerabilidad en ratones triple transgénicos 3xTg-AD y animales NTg desde los 12 meses de edad hasta el final de la vida. Este estudio tuvo un diseño longitudinal, donde se evaluaron los efectos de la administración crónica de la risperidona en los síntomas SCPD, a nivel cognitivo, social, conducta de enterramiento de objetos, a nivel fisiológico y supervivencia. Se observó que los factores, 'genotipo', 'tratamiento' y efecto interacción 'genotipo x tratamiento' se encontraron presentes en la mayoría de las conductas estudiadas, como por ejemplo: disminuyó la neofobia y mejoró el

desarrollo de la actividad exploratoria en el campo abierto en los ratones NTg, pero tuvo un débil efecto en estas variables en los ratones 3xTg-AD. La risperidona fue eficaz reduciendo el número de mármoles enterrados en los grupos de ratones que recibieron antipsicóticos con respecto a los grupos que se les administró solución salina. Estos resultados no sólo indican un perfil de ansiedad sino también alteraciones de otros procesos cognitivos en los ratones 3xTg-AD. Se puede concluir que el estudio 3 replicó, en los ratones 3xTg-AD, el aumento del riesgo de mortalidad observado a nivel clínico en humanos. Así, a pesar de que la risperidona permitió modificar las alteraciones en conducta social y la conducta de enterramiento de mármoles mostradas por los ratones 3xTg-AD, ejerció efectos negativos reduciendo la actividad exploratoria vertical y horizontal en los tests, y lo que es más relevante comprometió severamente la esperanza de vida del animal. De la misma manera, la risperidona ejerció efectos especialmente severos en los animales NTg en los animales viejos, modulando también, a nivel experimental, la ventana de vulnerabilidad temprana descrita para los efectos adversos de riesgo cerebrovascular (ACV) en ancianos tratados con antipsicóticos atípicos.

En conclusión el uso de risperidona incrementa el riesgo de mortalidad en la enfermedad de Alzheimer en edades avanzadas, lo que sugiere que este tratamiento se ha de utilizar a corto plazo en los síntomas que causan morbilidad, dolor en el paciente y para disminuir el potencial de daño a sí mismo. La decisión de utilizar antipsicóticos atípicos debe ser basada en la historia médica del paciente y tanto el beneficio como el riesgo del tratamiento.

Referencias bibliográficas

Referencias bibliográficas

Alves, L., Correia, A.S., Miguel, R., Alegria, P., Bugalho, P. (2012). Alzheimer's disease: A clinical practice-oriented review. *Front.Neurol.*, 3, 63.

American Psychiatric Association. (2002). *Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales (DSM-IV-TR) texto revisado*. MASSON.

Andrew, M.K., Mitnitski, A. B., Rockwood, K. (2008). Social vulnerability, frailty and mortality in elderly people. *PLoS One*, 3(5), e2232.

Andrew, M.K., Rockwood, K. (2010). Social vulnerability predicts cognitive decline in a prospective cohort of older Canadians. *Alzheimer's and Dementia*, 6(4), 319-325.e1.

Arranz, L., Giménez-Llort, L., De Castro, N. M., Baeza, I., De la Fuente, M. (2009). Social isolation during old age worsens cognitive, behavioral and immune impairment. *Rev.Esp.Geriatr.Gerontol.*, 44(3), 137-142.

Aultman, J. M., Moghaddam, B. (2001). Distinct contributions of glutamate and dopamine receptors to temporal aspects of rodent working memory using a clinically relevant task. *Psychopharmacology*, 153(3), 353-364.

Avitsur, R., Kinsey, S.G., Bidor, K., Bailey, M.T., Padgett, D. A., Sheridan, J. F. (2007). Subordinate social status modulates the vulnerability to the immunological effects of social stress. *Psychoneuroendocrinology*, 32(8-10), 1097-1105.

Avitsur, R., Kinsey, S.G., Bidor, K., Bailey, M.T., Padgett, D.A., Sheridan, J.F. (2007). Subordinate social status modulates the vulnerability to the

immunological effects of social stress. *Psychoneuroendocrinology*, 32(8-10), 1097-1105.

Azad, N., Al Bugami, M., Loy-English, I. (2007). Gender differences in dementia risk factors. *Gender Medicine*, 4(2), 120-129.

Baddeley, A. (2010). Working memory. *Curr.Biol.*, 20(4), R136-40.

Ballard, C.G., Gauthier, S., Cummings, J.L., Brodaty, H., Grossberg, G.T., Robert, P., Lyketsos, C.G. (2009). Management of agitation and aggression associated with alzheimer disease. *Nat.Rev.Neurol.*, 5(5), 245-255.

Ballard, C., Hanney, M. L., Theodoulou, M., Douglas, S., McShane, R., Kossakowski, K., Gill, R., Juszczak, E., Yu, Ly-Mee, Jacoby, R. (2009). The dementia antipsychotic withdrawal trial (DART-AD): Long-term follow-up of a randomised placebo-controlled trial. *The Lancet Neurology*, 8(2), 151-157.

Bardin, L., Kleven, M.S., Barret-Grevoz, C., Depoortere, R., Newman-Tancredi, A. (2006). Antipsychotic-like vs cataleptogenic actions in mice of novel antipsychotics having D2 antagonist and 5-HT1A agonist properties. *Neuropsychopharmacology*, 31(9), 1869-1879.

Belzung, C., Le Pape, G. (1994). Comparison of different behavioral test situations used in psychopharmacology for measurement of anxiety. *Physiol.Behav.*, 56(3), 623-628.

Bhalerao, S., Seyfried, L.S., Kim, H.M., Chiang, C., Kavanagh, J., Kales, H. C. (2012). Mortality risk with the use of atypical antipsychotics in later-life bipolar disorder. *J.Geriatr.Psychiatry Neurol.*, 25(1), 29-36.

Broekkamp, C.L., Rijk, H.W., Joly-Gelouin, D., Lloyd, K. L. (1986). Major tranquilizers can be distinguished from minor tranquilizers on the basis of effects on marble burying and swim-induced grooming in mice. *Eur.J.Pharmacol.*, 126(3), 223-229.

Bromley-Brits, K., Deng, Y., Song, W. (2011). Morris water maze test for learning and memory deficits in alzheimer's disease model mice. *J.Vis.Exp.*, (53). pii: 2920. doi(53), 10.3791/2920.

Bruins Slot, L.A., Kleven, M.S., Newman-Tancredi, A. (2005). Effects of novel antipsychotics with mixed D(2) antagonist/5-HT(1A) agonist properties on PCP-induced social interaction deficits in the rat. *Neuropharmacology*, 49(7), 996-1006.

Callaerts-Vegh, Z., Beckers, T., Ball, S.M., Baeyens, F., Callaerts, P.F., Cryan, J.F., Molnar, E, D'Hooge, R. (2006). Concomitant deficits in working memory and fear extinction are functionally dissociated from reduced anxiety in metabotropic glutamate receptor 7-deficient mice. *J.Neurosci.*, 26(24), 6573-6582.

Campdelacreu, J. (2012). Parkinson disease and alzheimer disease: Environmental risk factors. *Neurologia*,(article in press).

Castagne, V., Moser, P., Roux, S., Porsolt, R.D. (2011). Rodent models of depression: Forced swim and tail suspension behavioral despair tests in rats and mice. *Curr.Protoc.Neurosci.*, Editorial Board, Chapter 8, Unit 8.10A.

Chung, J.A., Cummings, J.L. (2000). Neurobehavioral and neuropsychiatric symptoms in alzheimer's disease: Characteristics and treatment. *Neurol.Clin.*, 18(4), 829-846.

Clinton, L.K., Billings, L.M., Green, K.N., Caccamo, A., Ngo, J., Oddo, S., McGaugh, J.L., LaFerla, F.M. (2007). Age-dependent sexual dimorphism in cognition and stress response in the 3xTg-AD mice. *Neurobiol.Dis.*, 28(1), 76-82.

Collette, F., Van der Linden, M., Salmon, E. (1999). Executive dysfunction in alzheimer's disease. *Cortex*, 35(1), 57-72.

Cope, M.B., Li, X., Jumbo-Lucioni, P., DiCostanzo, C.A., Jamison, W.G., Kesterson, R. A., Allison, D.B., Nagy, T.R. (2009). Risperidone alters food intake, core body temperature, and locomotor activity in mice. *Physiol.Behav.*, 96(3), 457-463.

Crawley, J. N. (1999). Behavioral phenotyping of transgenic and knockout mice: Experimental design and evaluation of general health, sensory functions, motor abilities, and specific behavioral tests. *Brain Res.*, 835(1), 18-26.

Crawley, J.N. (2004). Designing mouse behavioral tasks relevant to autistic-like behaviors. *Ment.Retard.Dev.Disabil.Res.Rev.*, 10(4), 248-258.

Crawley, J. N., Paylor, R. (1997). A proposed test battery and constellations of specific behavioral paradigms to investigate the behavioral phenotypes of transgenic and knockout mice. *Horm.Behav.*, 31(3), 197-211.

Crawley, J.N. (2007). Mouse behavioral assays relevant to the symptoms of autism. *Brain Pathol.*, 17(4), 448-459.

Crawley, J.N., Paylor, R. (1997). A proposed test battery and constellations of specific behavioral paradigms to investigate the behavioral phenotypes of transgenic and knockout mice. *Horm.Behav.*, 31(3), 197-211.

Cummings, J.L. (2000). Cognitive and behavioral heterogeneity in alzheimer's disease: Seeking the neurobiological basis. *Neurobiol.Aging*, 21(6), 845-861.

De la Fuente, M., Giménez-Llort, L. (2010). Models of aging of neuroimmunomodulation: Strategies for its improvement. *Neuroimmunomodulation*, 17(3), 213-216.

De Oliveira, M., Matias, P.,Ribeiro, J.E., De Sousa, R., Camelo, E., De Freitas, R., De Aguiar, A., Teixeira, G., De Moraes, K.,Sampaio, A., De Brito, E., Mendes S. (2008). Activities of the antipsychotic drugs haloperidol and risperidone on behavioural effects Induced by ketamine in mice. *Sci Pharm*, 76: 673–687.

Deacon, R.M.J., Cholerton, L.L., Talbot, K., Nair-Roberts, R., Sanderson, D.J., Romberg, C., Koros, E., Bornemann, K.D., Rawlins, JN.P. (2008). Age-dependent and -independent behavioral deficits in Tg2576 mice. *Behav.Brain Res.*, 189(1), 126-138.

Deacon, R.M., Rawlins, J.N. (2006). T-maze alternation in the rodent. *Nat.Protoc.*, 1(1), 7-12.

Deacon, R.M.J. (2006). Assessing nest building in mice. *Nat Protoc*, 1(3), 1117-1119.

Delotterie, D., Ruiz, G., Brocard, J., Schweitzer, A., Roucard, C., Roche, Y., Suaud-Chagny, M.F., Bressand, K., Andrieux, A. (2010). Chronic administration of atypical antipsychotics improves behavioral and synaptic defects of STOP null mice. *Psychopharmacology (Berl)*, 208(1), 131-141.

Denmark, A., Tien, D., Wong, K., Chung, A., Cachat, J., Goodspeed, J., Grimes, C., Elegante, M., Suci, C, Elkhayat, S., Bartels, B., Jackson, A.,Rosenberg, M.,

Chung, K., Badani, H., Kadri, F., Roy, S., Tan, J., Gaikwad, S., Stewart, A., Zapolsky, I., Gilde, T., Kalueff, A.V. (2010). The effects of chronic social defeat stress on mouse self-grooming behavior and its patterning. *Behav. Brain Res.*, 208(2), 553-559.

D'Hooge, R., De Deyn, P.P. (2001). Applications of the morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Res. Brain Res. Rev.*, 36(1), 60-90.

Di Carlo, M., Giacomazza, D., San Biagio, P.L. (2012). Alzheimer's disease: Biological aspects, therapeutic perspectives and diagnostic tools. *J. Phys. Condens Matter*, 24(24), 244102.

Didriksen, M., Skarsfeldt, T., Arnt, J. (2007). Reversal of PCP-induced learning and memory deficits in the morris' water maze by sertindole and other antipsychotics. *Psychopharmacology (Berl)*, 193(2), 225-233.

Djordjevic, J., Jones-Gotman, M., De Sousa, K., Chertkow, H. (2008). Olfaction in patients with mild cognitive impairment and alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging*, 29(5), 693-706.

Douglas, R.J. (1966). Cues for spontaneous alternation. *J. Comp. Physiol. Psychol.*, 62(2), 171-183.

Douglas, R.J., Raphelson, A. C. (1966). Spontaneous alternation and septal lesions. *J. Comp. Physiol. Psychol.*, 62(2), 320-322.

Dubois, B., Feldman, H.H., Jacova, C., Cummings, J.L., DeKosky, S.T., Barberger-Gateau, P., Delacourte, A., Frisoni, G., Fox, N.C., Galasko, D., Gauthier, S., Hampel, H., Jicha, G.A., Meguro, K., O'Brien, J., Pasquier, F., Robert, P., Rossor, M., Salloway, S., Sarazin, M., de Souza, L.C., Stern,

Y., Visser, P.J., Scheltens, P. (2010). Revising the definition of alzheimer's disease: A new lexicon. *The Lancet Neurology*, 9(11), 1118-1127.

Duff, K., Eckman, C., Zehr, C., Yu, X., Prada, C. M., Perez-tur, J., Hutton, M., Buee, L., Harigaya, Y., Yager, D., Morgan, D., Gordon, M.N., Holcomb, L., Refolo, L., Zenk, B., Hardy, J., Younkin, S. (1996). Increased amyloid-beta₄₂ (43) in brains of mice expressing mutant presenilin 1. *Nature*, 383(6602), 710-713.

Duran, J.C., Greenspan, A., Diago, J. I., Gallego, R., Martinez, G. (2005). Evaluation of risperidone in the treatment of behavioral and psychological symptoms and sleep disturbances associated with dementia. *Int.Psychogeriatr.*, 17(4), 591-604.

Dwyer, D. S., Donohoe, D. (2003). Induction of hyperglycemia in mice with atypical antipsychotic drugs that inhibit glucose uptake. *Pharmacol.Biochem.Behav.*, 75(2), 255-260.

Dyck, B.A., Skoblenick, K.J., Castellano, J.M., Ki, K., Thomas, N., Mishra, R.K. (2009). Behavioral abnormalities in synapsin II knockout mice implicate a causal factor in schizophrenia. *Synapse*, 63(8), 662-672.

España, J., Giménez-Llort, L., Valero, J., Miñano, A., Rábano, A., Rodríguez-Alvarez, J., LaFerla, F.M., Saura, C.A. (2010). Intraneuronal β -amyloid accumulation in the amygdala enhances fear and anxiety in alzheimer's disease transgenic mice. *Biol.Psychiatry*, 67(6), 513-521.

Estelles, J., Rodríguez-Arias, M., Maldonado, C., Aguilar, M.A., Miñarro, J. (2006). Gestational exposure to cocaine alters cocaine reward. *Behav.Pharmacol.*, 17(5-6), 509-515.

Fernández Teruel, A., Giménez Llord, L., Aguilar Heras, R., Tobella Pallares, A. (2005). Modelos animales en psiquiatría. In Madrid: STM Editores (Ed.), Tratado de psiquiatría, vol. I (pp. 341-356). Madrid: En J. Vallejo y C. Leal (eds.).

Filali, M., Lalonde, R., Rivest, S. (2009). Cognitive and non-cognitive behaviors in an APPswe/PS1 bigenic model of alzheimer's disease. *Genes Brain Behav*, 8(2), 143-148.

Filali, M., Lalonde, R. (2009). Age-related cognitive decline and nesting behavior in an APPswe/PS1 bigenic model of alzheimer's disease. *Brain Res.*, 1292, 93-99.

Filali, M., Lalonde, R., Rivest, S. (2011). Subchronic memantine administration on spatial learning, exploratory activity, and nest-building in an APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease. *Neuropharmacology*, 60(6), 930-936.

File, S.E., Hyde, J. R. (1978). Can social interaction be used to measure anxiety? *Br.J.Pharmacol.*, 62(1), 19-24.

File, S., Seth, P. (2003). A review of 25 years of the social interaction test. *Eur.J.Pharmacol.*, 463(1-3), 35-53.

Flirski, M., Sobow, T., Kloszewska, I. (2011). Behavioural genetics of alzheimer's disease: A comprehensive review. *Arch.Med.Sci.*, 7(2), 195-210.

Games, D., Adams, D., Alessandrini, R., Barbour, R., Berthelette, P., Blackwell, C., Carr, T., Clemens, J., Donaldson, T., Gillespie, F. (1995). Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein. *Nature*, 373(6514), 523-527.

Garcia-Mesa, Y., Lopez-Ramos, J. C., Giménez-Llort, L., Revilla, S., Guerra, R., Gruart, A., Laferla, F.M., Cristofol, R., Delgado-Garcia, J.M., Sanfeliu, C. (2011). Physical exercise protects against alzheimer's disease in 3xTg-AD mice. *J.Alzheimers Dis.*, 24(3), 421-454.

Gariépy, J.L., Gendreau, P. L., Cairns, R. B., Lewis, M. H. (1998). D1 dopamine receptors and the reversal of isolation-induced behaviors in mice. *Behav.Brain Res.*, 95(1), 103-111.

Garner, J.P., Weisker, S.M., Dufour, B., Mench, J. A. (2004). Barbering (fur and whisker trimming) by laboratory mice as a model of human trichotillomania and obsessive-compulsive spectrum disorders. *Comp.Med.*, 54(2), 216-224.

Gil-Bea, F.J., Aisa, B., Schliebs, R., Ramirez, M.J. (2007). Increase of locomotor activity underlying the behavioral disinhibition in tg2576 mice. *Behav.Neurosci.*, 121(2), 340-344.

Giménez-Llort, L., Rivas, H., Planas-Pujol, X., Garre-Olmo, J., Laferla, F.M., Vilalta-Franch, J., Lopez-Pousa, S. (2009). Early window of mortality risk on 3xTgAD mice treated with an antipsychotic drug at advanced stages of the disease. *Alzheimer's and Dementia*, 5(4, Supplement), P291.

Giménez-Llort, L., Blázquez, G., Cañete, T., Rosa, R., Vivo, M., Oddo, S., Navarro, X., LaFerla, F.M., Johansson, B., Tobeña, A., Fernández-Teruel, A. (2006). Modeling neuropsychiatric symptoms of Alzheimer's disease dementia in 3xTg-AD mice. In: Iqbal, k., Winblad, B., Avila, J., editors. *Alzheimer's Disease: New Advances*. Englewood, N.J., USA: Medimond; 2006. pp. 513-516.

Giménez-Llort, L., Blázquez, G., Cañete, T., Johansson, B., Oddo, S., Tobeña, A., LaFerla, F.M., Fernandez-Teruel, A. (2007). Modeling behavioral and

neuronal symptoms of alzheimer's disease in mice: A role for intraneuronal amyloid. *Neurosci.Biobehav.Rev.*, 31(1), 125-147.

Giménez-Llort, L., Garcia, Y., Buccieri, K., Revilla, S., Sunol, C., Cristofol, R., Sanfeliu, C. (2010). Gender-specific neuroimmunoendocrine response to treadmill exercise in 3xTg-AD mice. *Int.J.Alzheimers Dis.*, 2010, 128354.

Giménez-Llort, L., Martinez, E., Ferre, S. (1995). Dopamine-independent and adenosine-dependent mechanisms involved in the effects of N-methyl-D-aspartate on motor activity in mice. *Eur.J.Pharmacol.*, 275(2), 171-177.

Giménez-Llort, L., Mate, I., Manassra, R., Vida, C., De la Fuente, M. (2012). Peripheral immune system and neuroimmune communication impairment in a mouse model of alzheimer's disease. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, 1262(1), 74-84.

Giménez-Llort, L., Ramirez-Boix, P., García, Y., LaFerla, F.M., Sanfeliu, C. (2010). Modeling neuropsychiatric symptoms of alzheimer's disease in 3xTgAD mice: Neophobia, anxiety and aggressiveness at advanced stages of the disease. 6(4, Supplement), S227.

Götz, J., Ittner, L. M. (2008). Animal models of alzheimer's disease and frontotemporal dementia. *Nat.Rev.Neurosci.*, 9(7), 532-544.

Gould, G.G., Hensler, J.G., Burke, T.F., Benno, R.H., Onaivi, E.S., Daws, L.C. (2011). Density and function of central serotonin (5-HT) transporters, 5-HT1A and 5-HT2A receptors, and effects of their targeting on BTBR T+tf/J mouse social behavior. *J.Neurochem.*, 116(2), 291-303.

Graham, N.L., Emery, T., Hodges, J.R. (2004). Distinctive cognitive profiles in alzheimer's disease and subcortical vascular dementia. *Neurol.Neurosurg.Psychiatry.*, 75(1), 61-71.

Greene-Schloesser, D. M., Van der Zee, E. A., Sheppard, D. K., Castillo, M. R., Gregg, K. A., Burrow, T., Foltz, H., Slater, M., Bult-Ito, A. (2011). Predictive validity of a non-induced mouse model of compulsive-like behavior. *Behav. Brain Res.*, 221(1), 55-62.

Gresack, J.E., Frick, K.M. (2003). Male mice exhibit better spatial working and reference memory than females in a water-escape radial arm maze task. *Brain Res.*, 982(1), 98-107.

Gruart, A., López-Ramos, J.C., Muñoz, M.D., Delgado-García, J.M. (2008) Aged wild-type and APP, PS1, and APP + PS1 mice present similar deficits in associative learning and synaptic plasticity independent of amyloid load. *Neurobiol Dis* 30, 439-450.

Guayerbas, N., Catalán, M., Victor, V.M., Miquel, J., De la Fuente, M. (2001). Relation of behaviour and macrophage function to life span in a murine model of premature immunosenescence. *Behav. Brain Res.*, 134(1-2), 41-48.

Hall, C.S. (1934). Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. *Journal of Comparative Psychology*, 18(3), 385-403.

Hall, C.S. (1936). Emotional behavior in the rat. III. The relationship between emotionality and ambulatory activity. *Journal of Comparative Psychology*, 22(3), 345-352.

Haller, J., Varga, B., Ledent, C., Barna, I., Freund, T.F. (2004). Context-dependent effects of CB1 cannabinoid gene disruption on anxiety-like and social behaviour in mice. *Eur. J. Neurosci.*, 19(7), 1906-1912.

Hartl, D., Schuldt, V., Forler, S., Zabel, C., Klose, J., Rohe, M. (2012). Presymptomatic alterations in energy metabolism and oxidative stress in the APP23 mouse model of alzheimer disease. *J.Proteome Res.*, 11 (6), 3295–3304.

Hashimoto, H., Hashimoto, R., Shintani, N., Tanaka, K., Yamamoto, A., Hatanaka, M., Guo, X., Morita, Y., Tanida, M., Nagai, K., Takeda, M., Baba, A. (2009). Depression-like behavior in the forced swimming test in PACAP-deficient mice: Amelioration by the atypical antipsychotic risperidone. *J.Neurochem.*, 110(2), 595-602.

Haupt, M., Cruz-Jentoft, A., Jeste, D. (2006). Mortality in elderly dementia patients treated with risperidone. *J.Clin.Psychopharmacol.*, 26(6), 566-570.

He, J., Luo, H., Yan, B., Yu, Y., Wang, H., Wei, Z., Zhang, Y., Xu, H., Tempier, A., Li, X., Li, X.M. (2009). Beneficial effects of quetiapine in a transgenic mouse model of alzheimer's disease. *Neurobiol.Aging*, 30(8), 1205-1216.

Hedrich, H.J., Bulloch, G.R. (2004). The social behaviour of mice and its sensory control. *The handbook of experimental animals. the laboratory mice* (pp. 287-298). London: ELSEVIER. Academic Press.

Hess, S.E., Rohr, S., Dufour, B.D., Gaskill, B.N., Pajor, E.A., Garner, J.P. (2008). Home improvement: C57BL/6J mice given more naturalistic nesting materials build better nests. *J.Am.Assoc.Lab.Anim.Sci.*, 47(6), 25-31.

Hiroi, N., Zhu, H., Lee, M., Funke, B., Arai, M., Itokawa, M., Kucherlapati, R., Morrow, B., Sawamura, T., Agatsuma, S. (2005). A 200-kb region of human chromosome 22q11.2 confers antipsychotic-responsive behavioral abnormalities in mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 102(52), 19132-19137.

Ho, J.M., Murray, J.H., Demas, G.E., Goodson, J.L. (2010). Vasopressin cell groups exhibit strongly divergent responses to copulation and male-male interactions in mice. *Horm.Behav.*, 58(3): 368-77.

Holcomb, L.A., Gordon, M.N., Jantzen, P., Hsiao, K., Duff, K., Morgan, D. (1999). Behavioral changes in transgenic mice expressing both amyloid precursor protein and presenilin-1 mutations: Lack of association with amyloid deposits. *Behav.Genet.*, 29(3), 177-185.

Holtta, E.H., Laakkonen, M.L., Laurila, J.V., Strandberg, T.E., Tilvis, R.S., Pitkala, K.H. (2012). Apathy: Prevalence, associated factors, and prognostic value among frail, older inpatients. *J.Am.Med.Dir.Assoc.*, 13(6), 541-545.

Hou, Y., Wu, C.F., Yang, J.Y., Guo, T. (2006). Differential effects of haloperidol, clozapine and olanzapine on learning and memory functions in mice. *Prog.Neuro-Psychopharmacol.Biol.Psychiatry*, 30(8), 1486-1495.

Hsiao, K.K., Borchelt, D.R., Olson, K., Johannsdottir, R., Kitt, C., Yunis, W., Xu, S., Eckman, C., Younkin, S., Price, D. (1995). Age-related CNS disorder and early death in transgenic FVB/N mice overexpressing alzheimer amyloid precursor proteins. *Neuron*, 15(5), 1203-1218.

Huang, H., Liang, K., Ke, H., Chang, Y., Hsieh-Li, H.M. (2011). Long-term social isolation exacerbates the impairment of spatial working memory in APP/PS1 transgenic mice. *Brain Res.*, 1371(0), 150-160.

Huybrechts, K. F., Gerhard, T., Crystal, S., Olfson, M., Avorn, J., Levin, R., Lucas, JA., Schneeweiss, S. (2012). Differential risk of death in older residents in nursing homes prescribed specific antipsychotic drugs: Population based cohort study. *BMJ*, 344, e977.

Ishihama, T., Ago, Y., Shintani, N., Hashimoto, H., Baba, A., Takuma, K., Matsuda, T. (2010). Environmental factors during early developmental period influence psychobehavioral abnormalities in adult PACAP-deficient mice. *Behav.Brain Res.*, 209(2), 274-280.

Janus, C., Westaway, D. (2001). Transgenic mouse models of alzheimer's disease. *Physiol.Behav.*, 73(5), 873-886.

Jeste, D.V., Blazer, D., Casey, D., Meeks, T., Salzman, C., Schneider, L., Tariot, P., Yaffe, K. (2008). ACNP white paper: Update on use of antipsychotic drugs in elderly persons with dementia. *Neuropsychopharmacology*, 33(5), 957-970.

Kales, H. C., Kim, H. M., Zivin, K., Valenstein, M., Seyfried, L. S., Chiang, C., Cunningham, F., Schneider, L.S., Blow, F.C. (2012). Risk of mortality among individual antipsychotics in patients with dementia. *Am.J.Psychiatry*, 169(1), 71-79.

Kalman, J., Kalman, S., Pakaski, M. (2008). Recognition and treatment of behavioral and psychological symptoms of dementias: Lessons from the CATIE-AD study. *Neuropsychopharmacol.Hung.*, 10(4), 233-249.

Kalueff, A.V., Minasyan, A., Keisala, T., Shah, Z.H., Tuohimaa, P. (2006). Hair barbering in mice: Implications for neurobehavioural research. *Behav.Processes*, 71(1), 8-15.

Kalueff, A.V., Aldridge, J.W., LaPorte, J.L., Murphy, D.L., Tuohimaa, P. (2007). Analyzing grooming microstructure in neurobehavioral experiments. *Nat.Protoc.*, 2(10), 2538-2544.

Kalueff, A.V., Tuohimaa, P. (2004a). Contrasting grooming phenotypes in C57Bl/6 and 129S1/SvImJ mice. *Brain Res.*, 1028(1), 75-82.

Kalueff, A.V., Tuohimaa, P. (2004b). Grooming analysis algorithm for neurobehavioural stress research. *13*(3), 151-158.

Karelina, K., Norman, G.J., Zhang, N., DeVries, A.C. (2009). Social contact influences histological and behavioral outcomes following cerebral ischemia. *Exp.Neurol.*, *220*(2), 276-282.

Karlsson, R., Tanaka, K., Saksida, L. M., Bussey, T. J., Heilig, M., Holmes, A. (2009). Assessment of glutamate transporter GLAST (EAAT1)-deficient mice for phenotypes relevant to the negative and executive/cognitive symptoms of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*, *34*(6), 1578-1589.

Katz, I., de Deyn, P.P., Mintzer, J., Greenspan, A., Zhu, Y., Brodaty, H. (2007). The efficacy and safety of risperidone in the treatment of psychosis of alzheimer's disease and mixed dementia: A meta-analysis of 4 placebo-controlled clinical trials. *Int.J.Geriatr.Psychiatry*, *22*(5), 475-484.

Kaurav, B.P., Wanjari, M.M., Chandekar, A., Chauhan, N.S., Upmanyu, N. (2012). Influence of withania somnifera on obsessive compulsive disorder in mice. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, *5*(5), 380-384.

Kawakami, K., Shimosaki, S., Tongu, M., Kobayashi, Y., Nabika, T., Nomura, M., Yamada, T. (2007). Evaluation of bedding and nesting materials for laboratory mice by preference tests. *Exp.Anim.*, *56*(5), 363-368.

Keeling, L.J., Gonyou, H.W. (2001). *Social behaviour in farm animals*. London: CABI Publishing.

Keisala, T., Minasyan, A., Järvelin, U., Wang, J., Hämäläinen, T., Kalueff, A.V., Tuohimaa, P. (2007). Aberrant nest building and prolactin secretion in vitamin D receptor mutant mice. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.*, *104*(3-5), 269-273.

Kirschbaum, K. M., Henken, S., Hiemke, C., Schmitt, U. (2008). Pharmacodynamic consequences of P-glycoprotein-dependent pharmacokinetics of risperidone and haloperidol in mice. *Behav.Brain Res.*, 188(2), 298-303.

Kitazawa, M., Oddo, S., Yamasaki, T.R., Green, K. N., LaFerla, F.M. (2005). Lipopolysaccharide-induced inflammation exacerbates tau pathology by a cyclin-dependent kinase 5-mediated pathway in a transgenic model of alzheimer's disease. *J.Neurosci.*, 25(39), 8843-8853.

Kleijer, B.C., van Marum, R.J., Egberts, A.C., Jansen, P.A., Knol, W., Heerdink, E.R. (2009). Risk of cerebrovascular events in elderly users of antipsychotics. *J.Psychopharmacol.*, 23(8), 909-914.

Koh, H., Kim, D., Lee, J., Lee, S., Shin, H. (2008). Deficits in social behavior and sensorimotor gating in mice lacking phospholipase Cbeta1. *Genes Brain Behav*, 7(1), 120-128.

Kolkman, M.J.M., Streijger, F., Linkels, M., Bloemen, M., Heeren, D.J., Hendriks, W., Van der Zee, C. (2004). Mice lacking leukocyte common antigen-related (LAR) protein tyrosine phosphatase domains demonstrate spatial learning impairment in the two-trial water maze and hyperactivity in multiple behavioural tests. *Behav.Brain Res.*, 154(1), 171-182.

Kovacsics, C.E., Gould, T.D. (2010). Shock-induced aggression in mice is modified by lithium. *Pharmacol.Biochem.Behav.*, 94(3), 380-386.

Kyzar, E., Gaikwad, S., Roth, A., Green, J., Pham, M., Stewart, A., Liang, Y, Koblav., Kalueff, A.V. (2011). Towards high-throughput phenotyping of complex patterned behaviors in rodents: Focus on mouse self-grooming and its sequencing. *Behav.Brain Res.*, 225(2), 426-431.

La Barba, R.C., Martini, J., White, J. (1969). The effect of maternal-separation on the growth of ehrlich carcinoma in the balb-c mouse. *Psychosom.Med.*, 31(2), 129-133.

Lalonde, R., Lewis, T.L., Strazielle, C., Kim, H., Fukuchi, K. (2003). Transgenic mice expressing the β APP695SWE mutation: Effects on exploratory activity, anxiety, and motor coordination. *Brain Res.*, 977(1), 38-45.

Langen, B., Dost, R., Egerland, U., Stange, H., Hoefgen, N. (2012). Effect of PDE10A inhibitors on MK-801-induced immobility in the forced swim test. *Psychopharmacology (Berl)*, 221(2), 249-259.

LeDoux, J.E. (2000). Emotion circuits in the brain. *Annu.Rev.Neurosci.*, 23, 155-184.

Lewis, J., Dickson, D.W., Lin, W.L., Chisholm, L., Corral, A., Jones, G., Yen, S.H., Sahara, N., Skipper, L., Yager, D., Eckman, C., Hardy, J., Hutton, M., McGowan, E. (2001). Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP. *Science*, 293(5534), 1487-1491.

Lewis, J., McGowan, E., Rockwood, J., Melrose, H., Nacharaju, P., Van Slegtenhorst, M., Gwinn-Hardy, K., Paul Murphy, M., Baker, M., Yu, X., Duff, K., Hardy, J., Corral, A., Lin, W.L., Yen, S.H., Dickson, D.W., Davies, P., Hutton, M. (2000). Neurofibrillary tangles, amyotrophy and progressive motor disturbance in mice expressing mutant (P301L) tau protein. *Nat.Genet.*, 25(4), 402-405.

Leysen, J. E., Gommeren, W., Eens, A., de Chaffoy de Courcelles, D., Stoof, J.C., Janssen, P.A. (1988). Biochemical profile of risperidone, a new antipsychotic. *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, 247(2), 661-670.

Li, X., Morrow, D., Witkin, J.M. (2006). Decreases in nestlet shredding of mice by serotonin uptake inhibitors: Comparison with marble burying. *Life Sci.*, 78(17), 1933-1939.

Li, Y., Duffy, K.B., Ottinger, M.A., Ray, B., Bailey, J.A., Holloway, H.W., Tweedie, D., Perry, T., Mattson, M.P., Kapogiannis, D., Sambamurti, K., Lahiri, D.K., Greig, N.H. (2010). GLP-1 receptor stimulation reduces amyloid-beta peptide accumulation and cytotoxicity in cellular and animal models of alzheimer's disease. *J.Alzheimers Dis.*, 19(4), 1205-1219.

Lijam, N., Paylor, R., McDonald, M. P., Crawley, J.N., Deng, C.X., Herrup, K., Tweedie, D., Perry, T., Mattson, M.P., Kapogiannis, D., Sambamurti, K., Lahiri, D.K., Greig, N.H. (1997). Social interaction and sensorimotor gating abnormalities in mice lacking Dvl1. *Cell*, 90(5), 895-905.

Linck, V.M., da Silva, A.L., Figueiró, M., Caramão, E.B., Moreno, P.R.H., Elisabetsky, E. (2010). Effects of inhaled linalool in anxiety, social interaction and aggressive behavior in mice. *Phytomedicine*, 17(8-9), 679-683.

Maekawa, T., Kim, S., Nakai, D., Makino, C., Takagi, T., Ogura, H., Yamada, K., Chatton, B, Ishii, S. (2010). Social isolation stress induces ATF-7 phosphorylation and impairs silencing of the 5-HT 5B receptor gene. *EMBO J.*, 29(1), 196-208.

Malatynska, E., Steinbusch, H. W., Redkozubova, O., Bolkunov, A., Kubatiev, A., Yeritsyan, N.B., Vignisse, J., Bachurin, S., Strekalova, T. (2012). Anhedonic-like traits and lack of affective deficits in 18-month-old C57BL/6 mice: Implications for modeling elderly depression. *Exp.Gerontol.*, 47(8):552-64.

Mamelak, M. (2012). Sporadic alzheimer's disease: The starving brain. *J.Alzheimers Dis.*, 31(3):459-74.

Mannens, G., Huang, M.L., Meuldermans, W., Hendrickx, J., Woestenborghs, R., Heykants, J. (1993). Absorption, metabolism, and excretion of risperidone in humans. *Drug Metab.Dispos.*, 21(6), 1134-1141.

Martinez-Coria, H., Green, K.N., Billings, L.M., Kitazawa, M., Albrecht, M., Rammes, G., Parsons, C.G., Gupta, S., Banerjee, P., LaFerla, F.M. (2010). Memantine improves cognition and reduces alzheimer's-like neuropathology in transgenic mice. *Am.J.Pathol.*, 176(2), 870-880.

Mathis, C., Paul, S.M., Crawley, J.N. (1994). Characterization of benzodiazepine-sensitive behaviors in the A/J and C57BL/6J inbred strains of mice. *Behav.Genet.*, 24(2), 171-180.

Mathis, C., Paul, S. M., Crawley, J. N. (1994). The neurosteroid pregnenolone sulfate blocks NMDA antagonist-induced deficits in a passive avoidance memory task. *Psychopharmacology*, 116(2), 201-206.

Matsubara, Y., Ohnuma, T., Shibata, N., Takahashi, T., Arai, H. (2002). Plasma concentration of risperidone showed a correlation with daily dose, but not with age nor cytochrome P-450 2D6 gene polymorphisms in Japanese schizophrenics. *Psychogeriatrics*, 2: 284-288.

Matsushita, M., Egashira, N., Harada, S., Okuno, R., Mishima, K., Iwasaki, K., Nishimura, R., Fujiwara, M. (2005). Perospirone, a novel antipsychotic drug, inhibits marble-burying behavior via 5-HT_{1A} receptor in mice: Implications for obsessive-compulsive disorder. *J.Pharmacol.Sci.*, 99(2), 154-159.

Mattson, M. (2004). Pathways towards and away from alzheimer's disease. *Nature*, 430: 631-639.

Millan, M. J., Girardon, S., Mullet, J., Brocco, M., Dekeyne, A. (2002). Stereospecific blockade of marble-burying behaviour in mice by selective, non-peptidergic neurokinin1 (NK1) receptor antagonists. *Neuropharmacology*, 42(5), 677-684.

Mines, M.A., Yuskaitis, C.J., King, M.K., Beurel, E., Jope, R.S. (2010). GSK3 influences social preference and anxiety-related behaviors during social interaction in a mouse model of fragile X syndrome and autism. *PLoS One*, 5(3), e9706-e9706.

Miyakawa, T., Yamada, M., Duttaroy, A., Wess, J. (2001). Hyperactivity and intact hippocampus-dependent learning in mice lacking the M1 muscarinic acetylcholine receptor. *J.Neurosci.*, 21(14), 5239-5250.

Miyakawa, T., Leiter, L.M., Gerber, D.J., Gainetdinov, R.R., Sotnikova, T.D., Zeng, H., Caron, M., Tonegawa, S. (2003). Conditional calcineurin knockout mice exhibit multiple abnormal behaviors related to schizophrenia. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 100(15), 8987-8992.

Miyamoto, J., Tsuji, M., Takeda, H., Ohzeki, M., Nawa, H., Matsumiya, T. (2004). Characterization of the anxiolytic-like effects of fluvoxamine, milnacipran and risperidone in mice using the conditioned fear stress paradigm. *Eur.J.Pharmacol.*, 504(1-2), 97-103.

Moechars, D., Gilis, M., Kuiperi, C., Laenen, I., Van Leuven, F. (1998). Aggressive behaviour in transgenic mice expressing APP is alleviated by serotonergic drugs. *Neuroreport*, 9(16), 3561-3564.

Moretti, P., Bouwknecht, J.A., Teague, R., Paylor, R., Zoghbi, H.Y. (2005). Abnormalities of social interactions and home-cage behavior in a mouse model of rett syndrome. *Hum.Mol.Genet.*, 14(2), 205-220.

Morris, R.G.M. (1981). Spatial localization does not require the presence of local cues. *Learn.Motiv.*, 12(2), 239-260.

Moy, S.S., Nadler, J.J., Young, N.B., Nonneman, R.J., Segall, S.K., Andrade, G.M., Crawley, J.N., Magnuson, T.R. (2008). Social approach and repetitive behavior in eleven inbred mouse strains. *Behav.Brain Res.*, 191(1), 118-129.

Mutlu, O., Celikyurt, I. K., Ulak, G., Tanyeri, P., Akar, F. Y., Erden, F. (2012). Effects of olanzapine and clozapine on radial maze performance in naive and MK-801-treated mice. *Arzneimittelforschung*, 62(1), 4-8.

Mutlu, O., Ulak, G., Celikyurt, I. K., Akar, F. Y., & Erden, F. (2011). Effects of olanzapine, sertindole and clozapine on learning and memory in the morris water maze test in naive and MK-801-treated mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 98(3), 398-404.

Nelson, R. L., Guo, Z., Halagappa, V. M., Pearson, M., Gray, A. J., Matsuoka, Y., Brown, M., Martin, B., Iyun,T., Maudsley,S., Clark, R.F., Mattson, M.P. (2007). Prophylactic treatment with paroxetine ameliorates behavioral deficits and retards the development of amyloid and tau pathologies in 3xTgAD mice. *Exp.Neurol.*, 205(1), 166-176.

Njung'e, K., Handley, S.L. (1991). Evaluation of marble-burying behavior as a model of anxiety. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 38(1), 63-67.

Norton, M.C., Dew, J., Smith, H., Fauth, E., Piercy, K.W., Breitner, J.C., Tschanz, J., Wengreen, H., Welsh-Bohmer, K., Cache County Investigators (2012). Lifestyle behavior pattern is associated with different levels of risk for incident dementia and alzheimer's disease: The cache county study. *J.Am.Geriatr.Soc.*, 60(3), 405-412.

Oddo, S., Caccamo, A., Green, K.N., Liang, K., Tran, L., Chen, Y., Leslie, F.M., LaFerla, F.M. (2005). Chronic nicotine administration exacerbates tau pathology in a transgenic model of alzheimer's disease. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 102(8), 3046-3051.

Oddo, S., Caccamo, A., Kitazawa, M., Tseng, B. P., LaFerla, F.M. (2003). Amyloid deposition precedes tangle formation in a triple transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurobiol.Aging*, 24(8), 1063-1070.

Oddo, S., Caccamo, A., Shepherd, J. D., Murphy, M. P., Golde, T. E., Kaye, R., Metherate, R., Mattson, M.P., Akbari, Y., LaFerla, F.M. (2003). Triple-transgenic model of alzheimer's disease with plaques and tangles: Intracellular A β and synaptic dysfunction. *Neuron*, 39(3), 409-421.

Onor, M.L., Saina, M., Trevisiol, M., Cristante, T., Aguglia, E. (2007). Clinical experience with risperidone in the treatment of behavioral and psychological symptoms of dementia. *Prog.Neuro-Psychopharmacol.Biol.Psychiatry*, 31(1), 205-209.

Opara, J. (2012). Activities of daily living and quality of life in alzheimer disease. *J.Med.Life.*, 5(2), 162-167.

Pandey, D.K., Mahesh, R., Kumar, A.A., Rao, V.S., Arjun, M., Rajkumar, R. (2010). A novel 5-HT(2A) receptor antagonist exhibits antidepressant-like effects in a battery of rodent behavioural assays: Approaching early-onset antidepressants. *Pharmacol.Biochem.Behav.*, 94(3), 363-373.

Panza, F., Solfrizzi, V., Frisardi, V., Maggi, S., Sancarolo, D., Adante, F., D'Onofrio, G., Seripa, D., Pilotto, A. (2011). Different models of frailty in predementia and dementia syndromes. *J.Nutr.Health Aging*, 15(8), 711-719.

Papaleo, F., Silverman, J.L., Aney, J., Tian, Q., Barkan, C. L., Chadman, K.K., Crawley, J.N. (2011). Working memory deficits, increased anxiety-like traits, and seizure susceptibility in BDNF overexpressing mice. *Learn.Mem.*, 18(8), 534-544.

Paylor, R., Baskall, L., Wehner, J. (1993). Behavioral dissociations between C57BL/6 and DBA/2 mice on learning and memory tasks: A hippocampal-dysfunction hypothesis. *Psychobiology*, 21, 11-26.

Paylor, R., Tracy, R., Wehner, J., Rudy, J.W. (1994). DBA/2 and C57BL/6 mice differ in contextual fear conditioning but not in auditory fear conditioning. *Behav. Neurosci.*, 108, 1-8.

Pellow, S., Chopin, P., File, S. E., Briley, M. (1985). Validation of open: Closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J.Neurosci.Methods*, 14(3), 149-167.

Petit-Demouliere, B., Chenu, F., Bourin, M. (2005). Forced swimming test in mice: A review of antidepressant activity. *Psychopharmacology (Berl)*, 177(3), 245-255.

Phivilay, A., Julien, C., Tremblay, C., Berthiaume, L., Julien, P., Giguere, Y., Calon, F. (2009). High dietary consumption of trans fatty acids decreases brain docosahexaenoic acid but does not alter amyloid-beta and tau pathologies in the 3xTg-AD model of alzheimer's disease. *Neuroscience*, 159(1), 296-307.

Pietropaolo, S., Sun, Y., Li, R., Brana, C., Feldon, J., Yee, B. K. (2008). The impact of voluntary exercise on mental health in rodents: A neuroplasticity perspective. *Behav.Brain Res.*, 192(1), 42-60.

Pollak, D.D., Rey, C.E., Monje, F.J. (2010). Rodent models in depression research: Classical strategies and new directions. *Ann.Med.*, 42(4), 252-264.

Porsolt, R.D. (2000). Animal models of depression: Utility for transgenic research. *Rev.Neurosci.*, 11(1), 53-58.

Porsolt, R.D., Bertin, A., Blavet, N., Deniel, M., Jalfre, M. (1979). Immobility induced by forced swimming in rats: Effects of agents which modify central catecholamine and serotonin activity. *Eur.J.Pharmacol.*, 57(2-3), 201-210.

Porsolt, R.D., Le Pichon, M., Jalfre, M. (1977). Depression: A new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature*, 266(5604), 730-732.

Prajapati, R.P., Kalaria, M.V., Karkare, V.P., Parmar, S.K., Sheth, N.R. (2011). Effect of methanolic extract of *lagenaria siceraria* (molina) standley fruits on marble-burying behavior in mice: Implications for obsessive-compulsive disorder. *Pharmacognosy Res.*, 3(1), 62-66.

Ramos, A. (2008). Animal models of anxiety: Do I need multiple tests? *Trends Pharmacol.Sci.*, 29(10), 493-498.

Riedel, G., Kang, S. H., Choi, D.Y., Platt, B. (2009). Scopolamine-induced deficits in social memory in mice: Reversal by donepezil. *Behav.Brain Res.*, 204(1), 217-225.

Rimondini, R., Ferré, S., Giménez-Llort, L., Ögren, S.O.,Fuxe, K. (1998). Differential effects of selective adenosine A1 and A2A receptor agonists on dopamine receptor agonist-induced behavioural responses in rats. *Eur.J.Pharmacol.*, 347(2-3), 153-158.

Rinaldi, A., Mandillo, S., Oliverio, A., Mele, A. (2007). D1 and D2 receptor antagonist injections in the prefrontal cortex selectively impair spatial learning in mice. *Neuropsychopharmacology*, 32(2), 309-319.

Rockwood, K., Graham, J.E., Fay, S., ACADIE Investigators. (2002). Goal setting and attainment in alzheimer's disease patients treated with donepezil. *J.Neurol.Neurosurg.Psychiatry.*, 73(5), 500-507.

Rodgers, R.J., Boullier, E., Chatzimichalaki, P., Cooper, G.D., Shorten, A. (2002). Contrasting phenotypes of C57BL/6JOlaHsd, 129S2/SvHsd and 129/SvEv mice in two exploration-based tests of anxiety-related behaviour. *Physiol.Behav.*, 77(2-3), 301-310.

Rodriguez-Antona, C., Gurwitz, D., de Leon, J., Llerena, A., Kirchheiner, J., de Mesa, E. G., & Ibarreta, D. (2009). CYP2D6 genotyping for psychiatric patients treated with risperidone: Considerations for cost-effectiveness studies. *Pharmacogenomics*, 10(4), 685-699.

Rodriguez-Arias, M., Minarro, J., Aguilar, M.A., Pinazo, J., Simon, V.M. (1998). Effects of risperidone and SCH 23390 on isolation-induced aggression in male mice. *Eur.Neuropsychopharmacol.*, 8(2), 95-103.

Rogoz, Z. (2010). Effects of co-treatment with mirtazapine and low doses of risperidone on immobility time in the forced swimming test in mice. *Pharmacol.Rep.*, 62(6), 1191-1196.

Rogoz, Z., Kabzinski, M. (2011). Enhancement of the anti-immobility action of antidepressants by risperidone in the forced swimming test in mice. *Pharmacol.Rep.*, 63(6), 1533-1538.

Rondanelli, M., Sarra, S., Antonello, N., Mansi, V., Govoni, S., Falvo, F., Solerte, S.B., Ferrari, E. (2006). No effect of atypical antipsychotic drugs on weight gain and risk of developing type II diabetes or lipid abnormalities among nursing home elderly patients with alzheimer's disease. *Minerva Med.*, 97(2), 147-151.

Rondinini, C., Venerosi, A., Branchi, I., Calamandrei, G., Alleva, E. (1999). Long-term effects of prenatal 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT) exposure on intermale aggressive behaviour of mice. *Psychopharmacology*, 145(3), 317-323.

Rosario, E.R., Carroll, J.C., Pike, C.J. (2012). Evaluation of the effects of testosterone and luteinizing hormone on regulation of beta-amyloid in male 3xTg-AD mice. *Brain Res.*, 1466:137-45.

Royall, D.R., Palmer, R., Chiodo, L.K., Polk, M.J. (2012). Depressive symptoms predict longitudinal change in executive control but not memory. *Int.J.Geriatr.Psychiatry*, 27(1), 89-96.

Sabbagh, J. J., Kinney, J. W., & Cummings, J. L. (2012). Animal systems in the development of treatments for alzheimer's disease: Challenges, methods, and implications. *Neurobiol.Aging*, (Article in press).

Salzman, C., Jeste, D. V., Meyer, R.E., Cohen-Mansfield, J., Cummings, J., Grossberg, G.T., Jarvik, L., Kraemer, H.C., Lebowitz, B.D., Maslow, K., Pollock, B.G., Raskind, M., Schultz, S.K., Wang, P., Zito, J.M., Zubenko, G.S. (2008). Elderly patients with dementia-related symptoms of severe agitation and aggression: Consensus statement on treatment options, clinical trials methodology, and policy. *J.Clin.Psychiatry*, 69(6), 889-898.

Samaco, R.C., Fryer, J.D., Ren, J., Fyffe, S., Chao, H., Sun, Y., Greer, J.J., Zoghbi, H.Y., Neul, J.L. (2008). A partial loss of function allele of methyl-CpG-

binding protein 2 predicts a human neurodevelopmental syndrome. *Hum.Mol.Genet.*, 17(12), 1718-1727.

Sarna, J.R., Dyck, R.H., Wishaw, I.Q. (2000). The dalila effect: C57BL6 mice barber whiskers by plucking. *Behav.Brain Res.*, 108(1), 39-45.

Savoy, Y.E., Ashton, M.A., Miller, M.W., Nedza, F.M., Spracklin, D.K., Hawthorn, M.H., Rollema, H., Matos, F.F., Hajos-Korcsok, E. (2010). Differential effects of various typical and atypical antipsychotics on plasma glucose and insulin levels in the mouse: Evidence for the involvement of sympathetic regulation. *Schizophr.Bull.*, 36(2), 410-418.

Schellenberg, G.D., Montine, T.J. (2012). The genetics and neuropathology of alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.*, 124(3):305-23.

Schneider, L.S., Dagerman, K.S., Insel, P. (2005). Risk of death with atypical antipsychotic drug treatment for dementia: Meta-analysis of randomized placebo-controlled trials. *JAMA*, 294(15), 1934-1943.

Schreiber, S., Backer, M.M., Weizman, R., Pick, C.G. (1997). Augmentation of opioid induced antinociception by the atypical antipsychotic drug risperidone in mice. *Neurosci.Lett.*, 228(1), 25-28.

Scott, J.P. (1966). Agonistic behavior of mice and rats: A review. *Am.Zool.*, 6(4), 683-701.

Seligman, M.E., Beagley, G. (1975). Learned helplessness in the rat. *J.Comp.Physiol.Psychol.*, 88(2), 534-541.

Selkoe, D.J. (2000). Toward a comprehensive theory for alzheimer's disease. hypothesis: Alzheimer's disease is caused by the cerebral accumulation and cytotoxicity of amyloid beta-protein. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, 924, 17-25.

Selkoe, D.J. (2001). Alzheimer's disease: Genes, proteins, and therapy. *Physiol.Rev.*, 81(2), 741-766.

Shekelle, P., Maglione, M., Bagley, S., Suttorp, M., Mojica, W.A., Carter, J., Hilton L., Zhou A., Chen S., Glassman, P. (2007). Comparative Effectiveness of Off-Label Use of Atypical Antipsychotics. Comparative Effectiveness Review No. 6. (Prepared by the Southern California/RAND Evidence-based Practice Center under Contract No. 290-02-0003.) Rockville, MD: Agency for Healthcare Research and Quality.

Siegmund, A., Wotjak, C.T. (2007). A mouse model of posttraumatic stress disorder that distinguishes between conditioned and sensitised fear. *J.Psychiatr.Res.*, 41(10), 848-860.

Silverman, J.L., Tolu, S.S., Barkan, C.L., Crawley, J.N. (2010). Repetitive self-grooming behavior in the BTBR mouse model of autism is blocked by the mGluR5 antagonist MPEP. *Neuropsychopharmacology*, 35(4), 976-989.

Sokolowski, M.B. (2010). Social interactions in "simple" model systems. *Neuron*, 65(6), 780-794.

Spencer, C.M., Alekseyenko, O., Serysheva, E., Yuva-Paylor, L., Paylor, R. (2005). Altered anxiety-related and social behaviors in the Fmr1 knockout mouse model of fragile X syndrome. *Genes Brain Behav*, 4(7), 420-430.

Spielewoy, C., Roubert, C., Hamon, M., Nosten-Bertrand, M., Betancur, C., Giros, B. (2000). Behavioural disturbances associated with hyperdopaminergia in dopamine-transporter knockout mice. *Behav.Pharmacol.*, 11(3-4), 279-290.

Squire, L.R. (1992). Memory and the hippocampus: A synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. *Psychol.Rev.*, 99(2), 195-231.

Sterniczuk, R., Dyck, R.H., LaFerla, F.M., Antle, M.C. (2010). Characterization of the 3xTg-AD mouse model of alzheimer's disease: Part 1. circadian changes. *Brain Res.*, 1348(0), 139-148.

Streijger, F., Oerlemans, F., Ellenbroek, B.A., Jost, C.R., Wieringa, B., Van der Zee, C. (2005). Structural and behavioural consequences of double deficiency for creatine kinases BCK and UbCKmit. *Behav.Brain Res.*, 157(2), 219-234.

Terranova, M.L., Laviola, G. (2001). Delta-opioid modulation of social interactions in juvenile mice weaned at different ages. *Physiol.Behav.*, 73(3), 393-400.

Tempier, A.P. Quetiapine modulates anxiety-like behaviours and alleviates the decrease of BDNF in the amygdala of an APP/PS1 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. Supervisor: J. Steven Richardson and Xin-Min Li. University of Saskatchewan, Canada.

Tomida, S., Mamiya, T., Sakamaki, H., Miura, M., Aosaki, T., Masuda, M., Niwa, M., Kameyama, T., Kobayashi, J., Iwaki, Y., Imai, S., Ishikawa, A., Abe, K., Yoshimura, T., Nabeshima, T., Ebihara, S. (2009). Usp46 is a quantitative trait gene regulating mouse immobile behavior in the tail suspension and forced swimming tests. *Nat.Genet.*, 41(6), 688-695.

Tornell, J., Snaith, M. (2002). Transgenic systems in drug discovery: From target identification to humanized mice. *Drug Discov. Today*, 7(8), 461-470.

Trifiro, G., Spina, E., Gambassi, G. (2009). Use of antipsychotics in elderly patients with dementia: Do atypical and conventional agents have a similar safety profile? *Pharmacol. Res.*, 59(1), 1-12.

Tsunekawa, H., Noda, Y., Miyazaki, M., Yoneda, F., Nabeshima, T., Wang, D. (2008). Effects of (R)-(-)-1-(benzofuran-2-yl)-2-propylaminopentane hydrochloride [(-)-BPAP] in animal models of mood disorders. *Behav. Brain Res.*, 189(1), 107-116.

Tulving, E., Markowitsch, H.J. (1998). Episodic and declarative memory: Role of the hippocampus. *Hippocampus*, 8(3), 198-204.

Turner, L.H., Lim, C.E., Heinrichs, S.C. (2007). Antisocial and seizure susceptibility phenotypes in an animal model of epilepsy are normalized by impairment of brain corticotropin-releasing factor. *Epilepsy Behav*, 10(1), 8-15.

Uchida, N., Egashira, N., Iwasaki, K., Ishibashi, A., Tashiro, R., Nogami, A., Manome, N., Abe, M., Takasaki, K., Mishima, K., Takata, J., Oishi, R., Nishimura, R., Fujiwara, M. (2009). Yokukansan inhibits social isolation-induced aggression and methamphetamine-induced hyperlocomotion in rodents. *Biol. Pharm. Bull.*, 32(3), 372-375.

Van den Broek, F.A., Omtzigt, C.M., Beynen, A.C. (1993). Whisker trimming behaviour in A2G mice is not prevented by offering means of withdrawal from it. *Lab. Anim.*, 27(3), 270-272.

Van der Staay, F.J., Arndt, S.S., Nordquist, R.E. (2009). Evaluation of animal models of neurobehavioral disorders. *Behav. Brain Funct.*, 5, 11.

Vecchierini, M. . (2010). Sleep disturbances in alzheimer's disease and other dementias. *Psychol.Neuropsychiatr.Vieil*, 8(1), 15-23.

Venerosi, A., Valanzano, A., Alleva, E., Calamandrei, G. (2001). Prenatal exposure to anti-HIV drugs: Neurobehavioral effects of zidovudine (AZT) + lamivudine (3TC) treatment in mice. *Teratology*, 63(1), 26-37.

Vilalta-Franch, J., Lopez-Pousa, S., Garre-Olmo, J., Turon-Estrada, A., Pericot-Nierga, I. (2008). Mortality rates in patients with alzheimer's disease treated with atypical neuroleptic drugs. *Rev.Neurol.*, 46(3), 129-134.

Visser, P.J., Verhey, F.R.J., Ponds, R.W., Kester, A., Jolles, J. (2000). Distinction between preclinical alzheimer's disease and depression. *J.Am.Geriatr.Soc.*, 48(5), 479-484.

Vloeberghs, E., Coen, K., Van Dam, D., De Deyn, P.P. (2008). Validation of the APP23 transgenic mouse model of alzheimer's disease through evaluation of risperidone treatment on aggressive behaviour. *Arzneimittelforschung*, 58(6), 265-268.

Vorhees, C.V., Williams, M.T. (2006). Morris water maze: Procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nat.Protoc.*, 1(2), 848-858.

Walf, A.A., Frye, C.A. (2007). The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat.Protoc.*, 2(2), 322-328.

Wang, D., Noda, Y., Zhou, Y., Nitta, A., Furukawa, H., Nabeshima, T. (2007). Synergistic effect of galantamine with risperidone on impairment of social interaction in phencyclidine-treated mice as a schizophrenic animal model. *Neuropharmacology*, 52(4), 1179-1187.

Wang, D., Noda, Y., Zhou, Y., Nitta, A., Furukawa, H., Nabeshima, T. (2007). Synergistic effect of galantamine with risperidone on impairment of social interaction in phencyclidine-treated mice as a schizophrenic animal model. *Neuropharmacology*, 52(4), 1179-1187.

Wesson, D.W., Wilson, D.A. (2011). Age and gene overexpression interact to abolish nesting behavior in Tg2576 amyloid precursor protein (APP) mice. *Behav.Brain Res.*, 216(1), 408-413.

Williams, J.B., Pang, D., Delgado, B., Kocherginsky, M., Tretiakova, M., Krausz, T., Pan, D., He, J., McClintock, M.K., Conzen, S.D. (2009). A model of gene-environment interaction reveals altered mammary gland gene expression and increased tumor growth following social isolation. *Cancer.Prev.Res.(Phila Pa)*, 2(10), 850-861.

Willner, P. (2005). Chronic mild stress (CMS) revisited: Consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS. *Neuropsychobiology*, 52(2), 90-110.

Willner, P., Muscat, R., & Papp, M. (1992). Chronic mild stress-induced anhedonia: A realistic animal model of depression. *Neurosci.Biobehav.Rev.*, 16(4), 525-534.

Wolk, D.A., Dickerson, B.C., Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. (2010). Apolipoprotein E (APOE) genotype has dissociable effects on memory and attentional-executive network function in alzheimer's disease. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 107(22), 10256-10261.

Wood, N.I., Carta, V., Milde, S., Skillings, E.A., McAllister, C.J., Ang, Y.L., Duguid, A., Wijesuriya, N., Afzal, S., Fernandes, J., Leong, T.W., Morton, J. (2010). Responses to environmental enrichment differ with sex and genotype in

a transgenic mouse model of huntington's disease. *PLoS One*, 5(2), e9077-e9077.

Yamada, K., Nabeshima, T. (2000). Animal models of alzheimer's disease and evaluation of anti-dementia drugs. *Pharmacol.Ther.*, 88(2), 93-113.

Yochum, C.L., Bhattacharya, P., Patti, L., Mirochnitchenko, O., Wagner, G.C. (2010). Animal model of autism using GSTM1 knockout mice and early post-natal sodium valproate treatment. *Behav.Brain Res.*, 210(2), 202-210.

Yoon, S., Noh, J. S., Choi, S., Baik, J. (2010). Effects of atypical antipsychotic drugs on body weight and food intake in dopamine D2 receptor knockout mice. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 393(2), 235-241.

Zanettini, C., Carola, V., Lo Iacono, L., Moles, A., Gross, C., D'Amato, ,F.R. (2010). Postnatal handling reverses social anxiety in serotonin receptor 1A knockout mice. *Genes Brain Behav*, 9(1), 26-32.

Zhang, K., Grady, C.J., Tsapakis, E. M., Andersen, S.L., Tarazi, F.I., Baldessarini, R.J. (2004). Regulation of working memory by dopamine D4 receptor in rats. *Neuropsychopharmacology*, 29(9), 1648-1655.

Zheng, L., Mack, W. J., Dagerman, K. S., Hsiao, J. K., Lebowitz, B. D., Lyketsos, C. G., Stroup, T.S., Sultzer, D.L., Tariot, P.N., Vigen, C., Schneider, L.S. (2009). Metabolic changes associated with second-generation antipsychotic use in alzheimer's disease patients: The CATIE-AD study. *Am.J.Psychiatry*, 166(5), 583-590.

Zhou, Z.L., Li, X., Peng, H.Y., Yu, X.Y., Yang, M., Su, F.L., Wang, F., Zhu, R.H., Deng, C.Y., Lin, Q.X., Wang, C.Y., Li, W.B., Lin, S.G., Li, H.D. (2006). Multiple dose pharmacokinetics of risperidone and 9-hydroxyrisperidone in

chinese female patients with schizophrenia. *Acta Pharmacol.Sin.*, 27(3), 381-386.

Zou, H., Xie, Q., Zhang, M., Zhang, C., Zhao, G., Jin, M., Yu, L. (2009). Chronic alcohol consumption from adolescence-to-adulthood in mice--effect on growth and social behavior. *Drug Alcohol Depend.*, 104(1-2), 119-125.

Anexos

*Manuscript
[Click here to view linked References](#)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Impairment of nesting behavior in 3xTgAD mice

Virginia Torres-Lista^{1,2} and Lydia Giménez-Llort^{1,2*}

¹*Institute of Neuroscience and* ²*Department of Psychiatry and Forensic Medicine, School of Medicine,
Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain*

*Corresponding author:

Dra. Lydia Giménez-Llort,

Unitat de Psicologia Mèdica, M5-133

Departament de Psiquiatria i Medicina Legal

Facultat de Medicina, Edifici M, Campus Bellaterra, s/n

Universitat Autònoma de Barcelona

08193 Bellaterra, Spain

E-mail: lydia.gimenez@uab.cat

Tel: +34-93-5812378, FAX: +34-93-5811435

1
2 **Abstract**

3
4 Deterioration of executive functions and daily life activities (DLA) are early signs of Alzheimer's disease
5
6 (AD) that determine the need of caregiver attention. We have addressed this issue in the 3xTg-AD mice
7
8 model for AD characterizing nesting behaviour as a natural DLA of parental structures as well as at early-
9
10 (6 month-old) and advanced-stages (12 month-old) of the disease using the standard isolation protocols.
11
12
13 The results show genetic, gender and age-dependent impairment of nesting behaviour and aware about the
14
15 relevance of factors such as the temporal course of the nest construction and the nesting material chosen
16
17 to assess it. Paper towel consistently showed the impairment of nesting behavior in 3xTg-AD mice since
18
19 early stages of the disease and in both social conditions. Their nest construction was characterized by a
20
21 slow progressive temporal pattern and a poor quality of the nests, mostly in females and worsened at
22
23 advanced stages of the disease where the deficits were shown from the first day. In all cases, cotton
24
25 elicited an intense behaviour that lead to perfect nest during the first 48h. However, genotype, gender and
26
27 age differences could be found as a delay in the onset of the behaviour in the 3xTgAD mice, which was
28
29 more prominent in females but reduced by aging. The detailed description of the impairment of nesting
30
31 behaviour in 3xTg-AD provides another behavioral tool to assess the benefits of preventive and/or
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
therapeutical strategies, as well as the potential action of risk factors for AD on this animal model.

45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
Deterioration of executive functions and daily live activities (DLA) together with behavioral and
psychological symptoms of dementia (BPSD) are early signs of Alzheimer's disease (AD) and considered to
be the most important source of distress for patients and caregivers [1]. Nevertheless, most clinical studies
on therapeutical strategies are not restricted to the effects on memory loss but look for benefits in the three
behavioural features of the disease: cognitive loss, BPSD and abolishment of DLA [2]. This concern about
the complexity of the clinical manifestations of AD is translated to validation of animal models [3] and
preclinical behavioral screening considering more symptoms than those related to learning and memory

1 functions [4-7]. Still, a scarce number of studies consider natural species-typical behaviours such as nest-
2 building in spite of the interest of ancillary tests that imply active interaction with the environment, involve
3 executive functions and are the basis of the animals DLA [6-11]. The assessment of nesting behaviour is
4 easily and readily done, in a relative non-invasive manner since the standard protocols only require one
5 week of isolation [12].
6
7
8
9
10
11
12

13 In wild type mice nesting behaviour is considered to play a rol in maternal behaviour as a shelter from
14 outsiders that can be competitors or predators, while it facilitates family structure and maternal interaction
15 [13]. Although pregnant females tend to build the most complex nests, this behaviour extends to males and
16 nonpregnant females because nests do also play a rol as a niche and to provide thermal isolation that
17 contributes to the animals' thermoregulation [13,14,15]. In animal models for Alzheimer's disease, nesting
18 behaviour is found disrupted in an age-dependent manner in Tg2576 mice [10] and APP695Swe mutant [8]
19 although in APPswe/PS1 bigenic model of AD [7,9] the impairment was only observed in group-housed
20 conditions.
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32

33 The present study was aimed to characterize nesting behaviour in the triple-transgenic 3xTg-AD mice
34 harboring the familial AD mutations PS1/M146V, A β APPswe and tauP301L [16]. We determined the
35 effects of several factors such as genotype, gender, age or stage of the disease, social structure, time course
36 and nesting material on this daily life activity. For such a purpose, we studied the temporal course of nest
37 construction during 72 hours, using two different kind of naturalistic nesting materials (paper tissue and
38 cotton) in both genders of 3xTg-AD mice at early- and advanced-stages of the disease (6 and 12 month-old,
39 respectively) and as compared to age- and gender-matched non-transgenic mice (NTg) of its background
40 C57b/L6 x 129 strain. The study also addressed the issue from an ethological point of view, considering two
41 social conditions: a family structure driven by the future maternal affiliative behavior and the classical but
42 forced isolation procedure used in most studies on nesting behaviour.
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56

57 A total number of 140 male and female mice from the Spanish colonies [17] of homozygous 3xTg-AD
58 and NTg mice were used. The 3xTg-AD mice were genetically engineered at the University of California
59
60
61
62
63
64
65

to mice as previously described [16]. Animals were maintained in Macrolon cages under standard laboratory conditions of food and water *ad libitum*, 22 ± 2 °C, a 12 h light/dark and relative humidity 50-60%. Behavioral assessments were performed blind to the experimental groups and in accordance with Spanish legislation on “Protection of Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes” and the European Communities Council Directive (86/609/EEC Council) on this subject.

First, nest-building developed as natural affiliative behaviour was studied in a total of 24-26 parental structures (male and female) of the same genotype at 6 months of age, which in 3xTg-AD mice corresponds to early stages of the disease [16,18]. The home cages were supplied with 7 strips (70 x 20 mm) of paper towel and clean sawdust bedding. On the next day, 48 and 72 hours later, the nests were assessed according to Deacon [12] 5-point scale from 1 to 5 as follows: 1 – not noticeably touched, 2 – partially torn up, 3 – mostly shredded but often no identifiable site, 4 – identifiable but flat, 5 – perfect or nearly. The nesting constructed with paper towel was removed and one week later the home cage was supplied with two pieces of cotton (50 x 50 x 3mm, Cotofarm, S.L., Badalony, Spain). Nesting construction was assessed again as before. Beddings were not changed during all the experiment to avoid manipulation of animals and change of other environmental context than the nest material. Repeated measures ANOVA with a three factorial design (GxSxT) (G: effect of genotype, S: effect of gender, T: effect of time) was used followed by *post-hoc* Duncan's test. Results obtained for the same animals at two different points of time or using the two nestmate materials were analyzed with paired *t* test. Differences between two independent measures were analyzed with Student's test. $p < 0.05$ was considered statistical significant.

3.1.1. Nesting behaviour

The standard construction shown by parental structures of 3xTg mice (see Fig.1 and Table 1) showed a biphasic temporal pattern independently of the material provided [both materials: $p < 0.001$]. The nests started with mostly shredded nest site and were more accurate when using cotton, but thereafter the quality

of the nest was equal [Paired t-test, $p < 0.05$ only at 24h]. Both materials enabled to reach the highest score at 48h [$p < 0.001$] with perfect nest (score = 5) built by 96.15% or 100% animals using paper towel or cotton, respectively. In the 3x2y-AD mice the temporal patterns [both $p < 0.001$] were progressive or biphasic depending on the material provided (with paper towel and cotton, respectively). At every time point, the quality of the nests built by 3x2y-AD animals using cotton was higher than that achieved using paper towel [$p < 0.05$]. The ability to build perfect nests was also dependant on the material and was only achieved 100% with cotton.

When a combined analysis was analyzed for both genotypes together, nesting scores using paper towel and cotton were dependant on the time [$p < 0.001$]. Genetic differences arose only when paper towel was used [$p < 0.001$]. Thus, although at 24h the quality of the nests built with paper towel was equal in both genotypes, thereafter 3x2y-AD mice did not succeed in the improvement of their nests quality like N1y did, the highest score was reached at 72h instead of 48h and only a few parental structures built perfect nests as compared to the high incidence in N1y mice [$p < 0.01$]. In contrast, when cotton was supplied, the nest scores of N1y and 3x2y-AD were indistinguishable as all families built nests of the same quality and following the same biphasic pattern [all $n = 1$] with 100% of animals building perfect nests at 48h. Therefore, the paper towel was the material that enabled to observe genetic differences at both the temporal pattern and the maximum score achieved. In both genotypes, perfect nest were only built with cotton and it was with an incidence of 100%.

Childbirth behavior

In order to further characterize the nesting behaviour of 3x2y-AD mice at early and advanced stages of the disease [15-18], nine to ten age-matched animals of each genotype and gender were isolated for one week according to the standard protocols [12]. In this second experiment, a four factorial design (GxSxXxF

1 (G=effect of genotype, S=effect of gender, A=effect of age, T= effect of time) was used and the results were
2 analyzed as before.
3
4

5
6
7
8
9 (Add figure 2 here)
10

11
12
13 Genotype [$P<0.001$] and gender [$P<0.05$] effects were found in the nesting score of isolated animals
14 when using paper towel. The factor time exerted a strong effect [$P<0.001$] and interacted with all the other
15 factors [age, $P<0.01$; genotype x gender, $P<0.05$; genotype x gender x age, $P<0.05$]. The characteristics of
16 nesting behaviour in parental structures were also seen in isolated animals (see Fig. 2. and Table 1B).
17 Besides, at 6 months of age, the performance of female 3xTg-AD using paper was better than that of their
18 males counterparts [Student t-test, $P<0.05$]. With aging, male NTg mice built nests of poor quality and only
19 55,55% of them achieved score 5, closely resembling those of 3xTg-AD. In contrast, aging enhanced the
20 genetic differences in female mice with an important impairment seen in 3xTg-AD mice already at 24h
21 [Student t-test, $P<0.05$ at 24, 48 and 48h]. Genetic differences were also observed in the incidence of perfect
22 nests reaching statistical significance in males and females, at early- and advanced-stages of the disease,
23 respectively [Fisher's exact test, $P<0.05$].
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42

43 When cotton was provided, the standard measure of nesting score did not show any factor effect [all
44 *n.s.*], in agreement with the results in parental structures and the recent report in isolated 3xTg-AD mice
45 [11]. In all cases, the nest scores from NTg and 3xTgAD were indistinguishable, following a biphasic
46 temporal pattern [T, $P<0.001$] and maximum efficiency achieved in 100% cases already at 48h. However,
47 detailed analysis of the step-by-step behavioral response considering the onset of the behaviour evidenced
48 the existence of differences due to genotype [$P<0.01$], age [$P<0.001$] with genotype x age interaction effects
49 [$P<0.01$] (see Table 3). Besides, gender differences [$P<0.001$] could be observed when analysis was
50 restricted to the 12 month-old groups.
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

In summary, the present work reports impairment in nesting behaviour in 3X1p AD mice in social contexts driven by strong triggers such as the future offspring or the increase of thermoregulatory requirements by aging and isolation [13,14,15]. Paper towel used as nesting material consistently showed an impairment of nesting behaviour in 3X1p AD mice, since early stages of the disease and in both social conditions. It also showed that the deficits worsened with age and were gender-dependent, in agreement with the higher sensitivity shown by females 3X1p AD mice through the progress of the disease [19]. The slow progressive temporal pattern and the poor quality of the nests may reflect a worse ability in executive functions using certain materials [20]. In fact, the impairments were subtle to detect when a more naturalistic material, such as cotton, induced an intense response. Indeed, more naturalistic nesting materials are known to enable the construction of better nests similar to those built in the wild [20]. In such a situation, only those variables related to the onset of the interaction with the environment were useful to observe differences due to genotype, gender and age. Anxious, motivation, attention and fear, some of the psychological factors that determine the onset of interactive behaviours, are known to be altered in Alzheimer's disease. Similarly, HPSD-like profile described in 3X1p AD since early stages of the disease [3,17] may account for the delayed response to start the behaviour. In fact, we have previously described increased neophobia and anxiety-like behaviours in 3X1p AD mice that lead from reduced spontaneous exploration and novelty-seeking to freezing behaviour [3, 4, 21]. This profile is worsen with the progress of the disease in cortical and limbic areas [21] in parallel with cognitive deficits, mostly in females, and it is likely to be enhanced by isolation [22]. On the other hand, stereotyped sensorimotor actions developed during the nest-building can play also a role as coping with stress strategies or even resembling those observed in AD patients at advanced stages of the disease [3]. Nevertheless, the rapid chewing and

1 repetitive movements of paws and front limbs to pull and mesh the cotton are proposed by some authors as a
2 compulsive-like nest building mouse model with face validity relevant to OCD [23]. The major influence of
3 age on the onset of nesting behaviour could be also related to the relevance of nests to ensure thermal
4 isolation and maintenance of thermoregulation which are known to increase with aging and isolation
5 [14,15,24]. Thus, there are several factors and conditionants that modulate the impairment and are relevant
6 to take into account when studying this behaviour. Overall, the present work describes the impairment of
7 nesting behaviour in 3xTg-AD mice providing a tool in the repertory of DLA to be included in the
8 assessment of the benefits of preventive and/or therapeutical strategies but also in the evaluation of the
9 potential action of risk factors for AD.
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24

25 **Acknowledgements**

26 This study was supported by grants Instituto de Salud Carlos III ISC3P110/00283.
27
28
29
30
31
32

33 **References**

- 34
35
36
37
38 [1] Etters L, Goodall D, Harrison BE. Caregiver burden among dementia patient caregivers: a review of the
39 literature. *J Am Acad Nurse Pract.* 2008; 20:426-428.
40
41
42
43 [2] Litbrand H, Stenvall M, Rosendahl E. Applicability and effects of physical exercise on physical and
44 cognitive functions and activities of daily living among people with dementia: a systematic review. *Am J*
45 *Phys Med Rehabil* 2011; 90:495-518.
46
47
48
49 [3] Giménez-Llort L, Blázquez G, Cañete T, Johansson B, Oddo S, Tobeña A, LaFerla FM, Fernández-
50 Teruel A. Modeling behavioral and neuronal symptoms of Alzheimer's disease in mice: A role for
51 intraneuronal amyloid. *Neurosci Biobehav Rev* 2007; 31:125-147.
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2 [4] Garcia-Mesa Y, Lopez-Ramos JC, Gimenez-Llort L, Revilla S, Guerra R, Gruart A, LaFerla FM,
3 Cristófol R, Delgado-García JM, Sanfeliu C. Physical exercise protects against Alzheimer's disease in 3xTg-
4 AD mice. *J Alzheimers Dis* 2011; 24:421-454.
5
6
7
8
9
10 [5] Ratia M, Giménez-Llort L, Camps P, Muñoz-Torrero D, Pérez B, Clos MV, Badia A. Huprine X and
11 Huperzine A Improve Cognition and Regulate Some Neurochemical Processes Related with Alzheimer's
12 Disease in Triple Transgenic Mice (3xTg-AD). *Neurodegener* 2012; in press.
13
14
15
16
17
18 [6] Filali M, Lalonde R, Rivest S. Subchronic memantine administration on spatial learning, exploratory
19 activity, and nest-building in an APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease. *Neuropharmacology* 2011;
20 60:930-936.
21
22
23
24
25
26 [7] Filali M, Lalonde R, Rivest S. Cognitive and non-cognitive behaviors in an APPswe/PS1 bigenic model
27 of Alzheimer's disease. *Genes Brain Behav* 2009; 8:143-148.
28
29
30
31
32
33 [8] Deacon RMJ, Cholerton LL, Talbot K, Nair-Roberts R, Sanderson DJ, Romberg C, et al. Age-dependent
34 and -independent behavioral deficits in Tg2576 mice. *Behav Brain Res* 2008;189:126-138
35
36
37
38
39 [9] Filali M, Lalonde R. Age-related cognitive decline and nesting behavior in an APPswe/PS1 bigenic
40 model of Alzheimer's disease. *Brain Res* 2009; 1292: 93-99.
41
42
43
44
45 [10] Wesson DW, Wilson DA. Age and gene overexpression interact to abolish nesting behavior in Tg2576
46 amyloid precursor protein (APP) mice. *Behav Brain Res* 2011; 216:408-413.
47
48
49
50
51 [11] Filali M, Lalonde R, Theriault P, Julien C, Calon F, Planel E. Cognitive and non-cognitive behaviors in
52 the triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease expressing mutated APP, PS1, and Mapt (3xTg-
53 AD). *Behav Brain Res* 2012; 234:334-342.
54
55
56
57
58 [12] Deacon RMJ. Assessing nest building in mice. *Nat Protoc* 2006; 1:1117-1119.
59
60
61
62
63
64
65

- 1
2 [13] Brown RZ. Social behavior, reproduction, and population changes in the house mouse (*Mus musculus*
3 L). *Ecol Monogr* 1953; 23: 218-240.
4
5
6
7 [14] Latham N, Mason G. From house mouse to mouse house: the behavioral biology of free-living *Mus*
8 *musculus* and its implications in the laboratory. *Appl Anim Behav Sci* 2004; 86:261–289.
9
10
11
12 [15] Carter PA, Swallow JG, Davis SJ, Garland T. Nesting behavior of house mice (*Mus domesticus*)
13 selected for increased wheel-running activity. *Behav Genet* 2000; 30:85-94.
14
15
16
17 [16] Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kaye R, Metherate R, Mattson MP,
18 Akbari Y, LaFerla FM. Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles:
19 intracellular A β and synaptic dysfunction. *Neuron* 2003; 39: 409–421.
20
21
22
23 [17] Giménez-Llort L, Blázquez G, Canete T, Rosa R, Vivó M, Oddo S, Navarro X, LaFerla FM,
24 Johansson B, Tobena A, Fernández-Teruel A. Modeling neuropsychiatric symptoms of Alzheimer's disease
25 dementia in 3xTg-AD mice. In: Iqbal K, Winblad B, Avila J, editors. *Alzheimer's Disease: New Advances*.
26 Englewood, NJ, USA: Medimond; 2006. pp. 513–516.
27
28
29
30 [18] Billings L, Oddo S, Green KN, McLaugh JL, LaFerla F.M. Intraneuronal A β causes the onset of early
31 Alzheimer's disease-related cognitive deficits in transgenic mice. *Neuron* 2005; 45: 675–688.
32
33
34
35 [19] Clinton LK, Billings LM, Green KN, Caccamo A, Ngo J, Oddo S, McLaugh JL, LaFerla FM. Age-
36 dependent sexual dimorphism in cognition and stress response in the 3xTg-AD mice. *Neurobiol Dis* 2007;
37 28: 76-82.
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 [20] Hess SE, Rohr S, Dufour BD, Gaskill BN, Pajor EA, Garner JP. Home improvement: C57BL/6J mice
2 given more naturalistic nesting materials build better nests. *J Am Ass Lab Anim Sci* 2008; 47: 25-31.
3

4 [21] España J, Giménez-Llort L, Valero J, Miñano A, Rábano A, Rodríguez-Alvarez J, LaFerla FM, Saura
5 CA. Intra-neuronal β -Amyloid Accumulation in the Amygdala Enhances Fear and Anxiety in Alzheimer's
6 Disease Transgenic Mice. *Biol Psychiatry* 2010; 67:513-521.
7

8 [22] Arranz L, Giménez-Llort L, De Castro NM, Baeza I, De la Fuente M. Social isolation during old age
9 worsens cognitive, behavioral and immune impairment. *Rev Esp Geriatr Gerontol* 2009; 44: 137-42.
10

11 [23] Greene-Schloesser DM, Van der Zee EA, Sheppard DK, Castillo MR, Gregg KA, Burrow T, Foltz H,
12 Slater M, Bolt-Itto A. Predictive validity of a non-induced mouse model of compulsive-like behavior. *Behav*
13 *Brain Res* 2011; 221:55-62.
14

15 [24] Weinert D. Circadian temperature variation and ageing. *Ageing Res Rev.* 2010; 9:51-60.
16

17 Legends

18 **Fig.1.** Nesting score (mean \pm SEM) in parental structures of 6 month-old NTg and 3xTg-AD mice using
19 two kind of nest materials. $n=24-26$ per group. RMA: T, time effect; G, genotype effect; *** $P<0.001$.
20 Student's *t*-test ** $P<0.01$ vs. NTg mice. Paired *t*-test: ^a $P < 0.05$ 24h vs. 48 or 72h; ^b $P < 0.05$ 48h vs. 72h; ^c P
21 < 0.05 . cotton vs. paper towel.
22

23 **Fig 2.** Nesting score (mean \pm SEM) in social isolation of NTg and 3xTg-AD mice using two kind of nest
24 materials. $n=19-26$ per group. (A) male mice of 6 month old, (B) female mice of 6 month old, (C) male
25 mice of 12 month-old and (D) female mice of 12 month-old. Student's *t*-test *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$ and
26 * $P < 0.05$ vs NTg mice. Paired *t*-test: ^a $P < 0.05$ 24h vs. 48 or 72h; ^b $P < 0.05$ 48h vs. 72h; ^c $P < 0.05$ cotton
27 vs. paper towel. Student's *t*-test: ^d $P < 0.05$ gender (same age and genotype) and ^e $P < 0.05$ 6m vs. 12m age
28 (same gender and genotype).
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65**Table 1**

Fisher exact test, Incidence of nesting score 5, *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ vs NTg genotype. ^{cc} $P < 0.01$ using cotton vs paper towel.

Table 2

Results are expressed in minutes, as the mean \pm S.E.M. ANOVA, genotype effect, $P < 0.01$; age effect, $P < 0.01$; genotype x age interaction effect, $P < 0.01$. Post-hoc Duncan's test, * $P < 0.05$ vs. corresponding NTg mice and ^e $P < 0.05$ vs. corresponding 6 month-old group. Student *t*-test, ^d $P < 0.05$ vs. corresponding male gender.

Figure 1

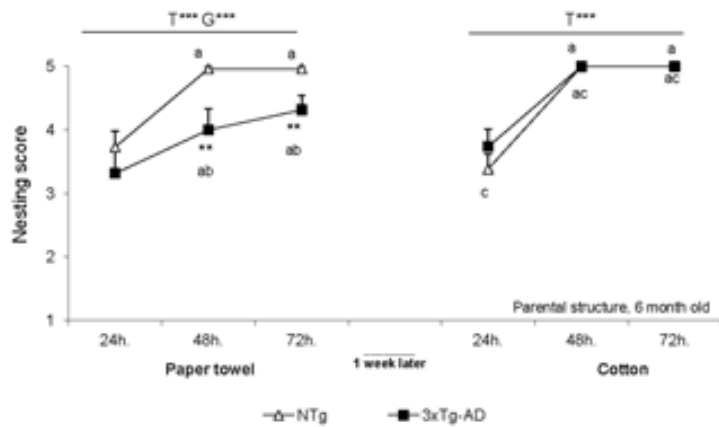
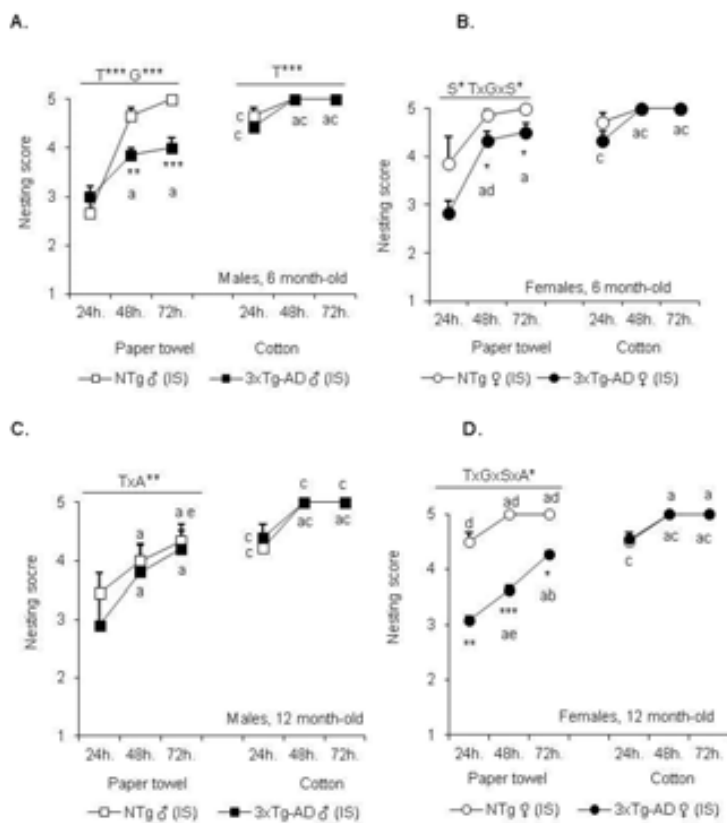


Figure 2





Scientific interest of social behaviour in animal models of human diseases

Journal:	Comparative Medicine
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Overviews (review articles)
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Torres-Lista, Virginia; Autonomous University of Barcelona, Institute of Neuroscience; Autonomous University of Barcelona, Psychiatry and Forensic Medicine, School of Medicine Giménez-Llort, Lydia; Autonomous University of Barcelona, Institute of Neuroscience; Autonomous University of Barcelona, Department of Psychiatry and Forensic Medicine
Keywords:	Mice < Animal species, Neurologic diseases (Alzheimer, MS, Parkinson) < Health conditions, Drugs/Pharmaceuticals, Animal management and use, Behavior < Miscellaneous

SCHOLARONE™
Manuscripts

Only

For questions contact journals@aaas.org

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1 **Title:** Scientific interest of social behaviour in animal models of human diseases

2 **Authors:** Virginia Torres-Lista ^{1,2}, Lydia Giménez-Llort ^{1,2,*}

3 **Affiliation:** ¹ Institut of Neurosciences and ² Medical Psychology Unit, Department of
4 Psychiatry and Forensic Medicine, School of Medicine, Autonomous University of
5 Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain

6 **Corresponding Author:** Lydia Giménez-Llort

7
8 Department de Psiquiatria i Medicina Legal
9 Facultat de Medicina, Edifici M, Campus Bellaterra, s/n
10 Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra
11 Barcelona, Spain

11 **E-mail:** lidia.gimenez@uab.cat

12

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

13 **Abstract**

14 The overview shows that the scientific interest in social behaviour in mice has
15 exponentially grown in the last two decades in parallel with advances in biotechnology and
16 the emergence of genetically engineered mice. Most of the studies are
17 psychopharmacological or look for the neurochemical bases of social behaviour and its
18 alterations. However, the role of social behaviour *per se* is increasing mainly in those
19 research works aimed to model neuropsychiatric and neurodegenerative diseases. In fact, at
20 the translational level, the study of social behaviour in murine models is relevant because
21 changes in social behaviour are present in most neuropsychiatric and neurodegenerative
22 disorders as well as in other diseases that, directly or indirectly, affect the sphere of social
23 relationships. The consideration of social behaviour in the experimental design of basic and
24 translational research works using murine models may improve the predictive validity of
25 new preventive and/or therapeutic strategies. The present work provides conceptual
26 description of social behaviour in mice, the tests used to measure it and analyzes its
27 increasing interest, mostly in the area of neuroscience. It reviews the 821 scientific studies
28 (in English) included in the MEDLINE database from 1930 to July 2012. Keywords used
29 for the search were those related to the different kinds of social behaviour (spontaneous or
30 induced) in mice and took into account the diversity of experimental paradigms (dyads,
31 groups, parental relationships, isolation) and the wide spectrum of behavioural tests
32 available. (235 words)

33 **Key words.** Animal models. Basic and translational research. Social behaviour.

34 **Header words:** Social behaviour in animals models

For questions contact journals@aafas.org

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

35 **Figures: 2**

36 **Tables: 2**

37 **Social behaviour in mice**

38
39 Most living organisms are organized by social structures that facilitate the development of
40 vital functions of the species such as survival (protection from predators), nutrition
41 (collecting and providing food) and the continuity of the species itself (facilitation of the
42 reproduction). Social structures are dynamic and when situations of inter or intra-specific
43 conflicts appear social structures change in order to find the balance. At the clinical level, it
44 is described that the social pattern is significantly altered in many neurological and
45 psychiatric diseases, and this affects the development of daily routines and the quality of
46 the interaction with their counterparts.

47

48 From basic research, animal models for neurological and psychiatric diseases try to mimic
49 these behavioural patterns in order to provide experimental models which, with more or
50 less validity, can be used to study the underlying biological and psychological
51 phenomenon. Furthermore, these models provide the opportunity to assess preventive
52 and/or therapeutic strategies. Rat was earlier considered to be the excellent animal model
53 for scientific studies. However, recent advancement in biotechnology has made mice to
54 emerge as the rodent specie of choice in generation of a wide range of genetic and
55 psychopharmacological models.²⁰ Therefore, this paper reviews the existing literature on
56 social behaviour in mice, including historical evolution of behavioural testings. The paper

For questions contact journals@aaas.org

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

57 also assesses the use of behavioural tools in the study of basic traits and social behaviour in
58 different animal models for diseases of interest.

59
60 Searches were made in MEDLINE for published studies in the English language from the
61 beginning of the data base (1930) to July 2012 using the keywords: 'mice' 'social
62 interaction', 'barbering', 'tube test', 'nesting behaviour', 'maternal separation/deprivation'
63 'isolation', 'resident intruder test', 'sexual behaviour', 'maternal behaviour', 'social
64 recognition test', 'olfactory discrimination test' and 'playing behaviour'. The number of
65 scientific papers found was 821.

66 67 **Scientific interest for the study of social behaviour in mice** 68

69 Since 1930 there has been a substantial increase in both basic and translational scientific
70 research on social behaviours in mice. The first studies basically focused on the
71 characterization of social behaviour *per se*. It was not until the early 60's that biological
72 approaches and the use of animal (rodents) models to study varied diseases including
73 neurological and psychiatric disorders and their impact on social relationships, were
74 established. In the 90's the number of scientific publications in different areas (see figure 1)
75 and using a diversity of behavioural tests (see figure 2) experienced an exponential
76 increase. Among the most relevant issues is the use of social interaction test¹⁶, the resident-
77 intruder test to measure aggression and the model of maternal deprivation mainly used to
78 assess the ontogenetic hypothesis of schizophrenia.

79
80 [add Figure 1 and Figure 2 here]

For questions contact journals@aalas.org

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
6081 **Social behaviour, behavioural tests and modeling of diseases**

82

83 Social behaviour is a fundamental characteristic of living organisms and is defined as an
84 interaction between members of the same specie.⁵⁷ Normal social structures implicitly
85 involve behaviours with varying degrees of hierarchy or equality, depending on genetic
86 factors (mouse strain, gender, age, genetic mutations or neurochemical systems) and
87 environmental (conditions of housing, feeding, temperature, isolation, dyads or social group
88 membership, perinatal development.). Social behaviours, as stated before, are dynamic
89 structures, whose deviations by default (i.e. apathy, anhedonia, isolation) or excess (i.e.
90 aggressiveness, irritability, sexual aggression) can reach pathological range and therefore
91 become diagnostic criteria for neurological and psychiatric diseases. In addition, alterations
92 of social behaviours are also symptoms of other organic diseases (see Table 1).

93

94 *[add Table 1 here]*

95

96 When studying social behaviours, several important concepts are taken into account. For
97 instance, in any animal group each subject has social attributes that influence its social
98 relationships with other animals. Related to this, is the concept of *sociability* which is
99 defined as "the tendency to form cooperative interdependent relationships that allow two-
100 way communication which transcends mere sexual activity".⁴⁶ Nevertheless, the
101 organization of a group is one of the most significant goals for many animal species, and is
102 the basis of social organization.⁴⁶ Each species has developed patterns of behaviour and
103 physiological mechanisms that are related to their own social organization and population
104 dynamics.²⁹ It is, therefore, important to note that results obtained in behavioural paradigms

For questions contact journals@aaas.org

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

105 in rats may be different from that obtained in mice.⁵¹ In turn, there are also differences
106 between mice depending on the strains a factor which is usually underestimated (the strain
107 used is the one available rather than the one with the proper behavioural profile).⁵¹
108

109 It's been told that the social structure of a group depends mainly on the dominance-
110 subordination relationships and/or other attributes such as aggressiveness, competitiveness,
111 individualism, etc.⁴⁶ Thus, *dominance* is defined as a learned and predictable relationship
112 established between a pair of animals (dyad) where an animal is subordinate by its
113 partner. In this context, *ranges*, *hierarchy* and the *order of dominance* represent the
114 assignment of a numerical value to an animal, in the attempt to describe the relative
115 position of an animal in its social group.²⁰ On the contrary, there are social structures where
116 *agonistic behaviour* is observed. These are the result of adaptive actions to solve conflicts
117 arising between two members of the same specie through aggressive behaviour or threats,
118 submissive or passive behaviours and playing behaviours involving physical contact.²⁷

119 *Aggressive behaviour* is a behaviour that causes harm or destruction to animals. In most
120 animal species, males are more aggressive than females. Some authors classify the
121 aggressiveness in *aggressive competition*, where two individuals within a group compete
122 for the same resource and *territorial aggression* when aggression is directed to an animal
123 who is considered has invaded a territory.⁴⁶ Based on these concepts, early studies in mice
124 also used the *social hierarchy testing (SHT)* to assess each animal's social rank within their
125 group. That is, animals were classified in *rank 1*: dominant, *rank 2*: active- subordinated,
126 *rank 3*: subordinated liabilities and *rank 4*, submissive.⁴⁹

127
128 In the decade of the 60'-70's a clear scientific interest for social behaviour is observed and

For questions contact journals@aafas.org

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

129 new methods, such as the *social interaction test (SIT)*, are used. The test evaluate both the
130 social and non-social behaviours and distinguish a great variety of behavioural elements
131 such as *social investigation* (sniffing the anogenital region, the head, or the snout of the
132 partner), *follow* (following the partner around the cage), *squire* (following the moving
133 partner while maintaining a constant nose contact with its fur), *push under* (pushing the
134 snout or the whole anterior part of the body under the partner's body, and then resting),
135 *crawl over* (crawling over the partner's back, crossing it transversally from one side to the
136 other), *mutual circle* (partners mutually sniffing each other's anogenital region, while
137 describing tight circles), *vibrating tail* and *aggressive behaviour* (including fighting
138 accompanied by biting and blows to the head) as well as *social inactivity* (lying flat or
139 standing still while maintaining close physical contact with the partner). Among non-social
140 behaviours the SIT evaluates several actions such as *exploring* (moving around the cage,
141 rearing, sniffing the air, the walls or the sawdust), *digging* (digging in the sawdust, pushing
142 and kicking it around using the snout and/or both the forepaws and hind paws) and *self-*
143 *grooming* (wiping, licking, combing, or scratching any part of own body).⁶⁷

144
145 The component of learning and memory in social behaviour can also be studied and
146 evaluated using two behavioural tests: the *Social Recognition test (SR)* in which the animal
147 must be able to recognize the resident of a cage after having been previously exposed to its
148 smell³⁹ and the *Olfactory discrimination test (ODT)* based on the ability of animals to
149 discriminate two different smells (i.e. the smell of almonds versus that of lemons).⁴⁹

150
151 Dominance relationships often have an implicit element of aggression that can be evaluated
152 with the *social dominance tube test (DTT)*. In this test two mice of the same genotype and

For questions contact journals@aaas.org

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

153 gender are placed at opposite ends of an acrylic tube and released. A subject is declared a
154 "winner" when its opponent backs out of the tube.⁵⁰

155
156 *Home cage sleeping behaviour (SB)* evaluates the percentage of animals sleeping huddled
157 in the same quadrant in each cage, and it is known to be impaired in animal models of
158 psychiatric illness such as schizophrenia.³⁰

159
160 In the *Dalila effect or barbering*, animals show shaved whiskers and hair loss which can be
161 automatically generated by the animal itself or by a cagemate, usually the most dominant,
162 namely the 'Dalila mouse'. Scarce research is devoted to this phenomenon and it is
163 speculated whether it is due to dominance, if it involves some level of aggression and,
164 therefore, suffering or pain in the animal that receives it, while other authors consider that
165 at least we can speak of a behaviour derived from social anxiety. To classify the Dalila
166 effect the following scale is used: 0: no barbering, 1: whisker removal or shortening, 2:
167 snout/face denuding, 3: individual bald patches on head and body, 4: multiple alopecic
168 areas on head and/or body, 5: severe alopecia including complete snout denuding and large
169 pronounced alopecic areas on head and body.⁷

170
171 On the other hand, there's a group of social behaviours directly linked to reproductive
172 functions, upbringing and ontogenetic maturation of the litters. They can be measured
173 through a variety of successive events: mating, nesting, maternal care and games. The
174 *sexual Behaviour (SB)* of the male is quantified by the latency and frequency of mounts,
175 intromissions and ejaculations, while the female measures the level of lordosis.⁴⁸ The
176 *nesting behaviour (NB)* evaluates the ability of the animal to make its nest construction¹⁰

For questions contact journals@aalas.org

1
2
3 177 while the *parental behaviour (PB)* includes measures of protective behaviours, cleaning
4
5 178 and food supply from mother to offspring.⁴ In the *social play behaviour (SPB)* the elements
6
7 179 under consideration are those of social interaction but in this case the range of age of the
8
9 180 individuals is postnatal.⁶⁶
10
11

12 181
13
14 182 In other behavioural paradigms, the experimenter alters the normal conditions of housing of
15
16 183 animals in order to induce changes or disrupt social behaviour (*induced social behaviour*).
17
18 184 For instance, in the *social isolation-induced (II)* the animal is isolated for a month in order
19
20 185 to increase its aggressiveness. Thereafter, the territorial aggression towards an *intruder*
21
22 186 mice can be measured by the *resident-intruder test (RIT)*. The latency of first attack,
23
24 187 number of attacks and the time of persecution by the aggressive resident are measured.²⁴ A
25
26 188 variant of this test is the *Social Disruption stress (SDR)* in which, using a similar procedure,
27
28 189 the aggressive behaviour of a group of animals living in the same cage against a
29
30 190 single attacker is being measured in a 2 minutes test.⁶⁶ In studies of ontogeny, maternal
31
32 191 deprivation or temporary isolation rearing *maternal deprivation (MD)* (usually 24 hours,
33
34 192 during the ninth postnatal day) is used to model emotional disorders and psychiatric field
35
36 193 that allow the hypothesis on the basis ontogenetic diseases such as schizophrenia.²
37
38 194
39
40
41
42
43
44

45 195 [add Table 2 here]
46
47

48 196
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

For questions contact journals@aalas.org

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

197

Conclusions

198

199

Although the first reports on social behaviour in mice were done in the 30's, it was in the 70's that clear scientific interest was raised. Soon after, due to the use of genetically engineered mice, interest in this field witnessed an exponential growth. Disorders in social behaviour are characteristic of many mental disorders such as autism, schizophrenia, depression and Alzheimer's disease. These diseases have been mimicked in animal models of mice. At the moment, basic research in social behaviour is related to gender, aggression and parental relationships. The understanding of the biological and psychological basis of social behaviour is becoming increasingly relevant. Importantly, the consideration of social behaviour in the experimental design of basic and translational research works using murine models may improve the predictive validity of new preventive and/or therapeutic strategies.

210

Acknowledgments

This work was supported by Instituto de Salud Carlos III ISC3-PI10/00283

212

213

References

1. Avitsur R, Kinsey SG, Bidor K, Bailey MT, Padgett DA, Sheridan JF. 2007. Subordinate social status modulates the vulnerability to the immunological effects of social stress. *Psychoneuroendocrinology* **32**:1097-1105.
2. Avitsur R, Stark JL, Sheridan JF. 2001. Social Stress Induces Glucocorticoid Resistance in Subordinate Animals. *Horm Behav* **39**:247-257.

For questions contact journals@aalas.org

- 1
2
3
4 219 3. **Bolivar VJ, Walters SR, Phoenix JL.** 2007. Assessing autism-like behaviour in mice:
5
6 220 Variations in social interactions among inbred strains. *Behav Brain Res.* **176**:21-26.
7
8 221 4. **Branchi I, D'Andrea I, Gracci F, Santucci D, Alleva E.** 2009. Birth spacing in the
9
10 222 mouse communal nest shapes adult emotional and social behaviour. *Physiol Behav*
11
12 223 **96**:532-539.
13
14 224 5. **Caldwell HK, Dike OE, Stevenson EL, Storck K, Young III WS.** 2010. Social
15
16 225 dominance in male vasopressin 1b receptor knockout mice. *Horm Behav* **58**:257-263.
17
18 226 6. **Callaerts-Vegh Z, Beckers T, Ball SM, Baeyens F, Callaerts PF, Cryan JF.** 2006.
19
20 227 Concomitant deficits in working memory and fear extinction are functionally
21
22 228 dissociated from reduced anxiety in metabotropic glutamate receptor 7-deficient mice. *J*
23
24 229 *Neurosci* **26**:6573-6582.
25
26 230 7. **Cohen-Salmon C, Cartier M, Roubertoux P, Jouhaneau J, Semal C, Paillette M.**
27
28 231 1985. Differences in patterns of pup care in mice V—Pup ultrasonic emissions and pup
29
30 232 care behaviour. *Physiol Behav* **35**:167-174.
31
32 233 8. **Crawley JN, Paylor R.** 1997. A Proposed test battery and constellations of specific
33
34 234 behavioural paradigms to investigate the behavioural phenotypes of transgenic and
35
36 235 knockout mice. *Horm Behav* **31**:197-211.
37
38 236 9. **Crawley JN, Schleidt WM, Contrera JF.** 1975. Does social environment decrease
39
40 237 propensity to fight in male mice? *Behav Biol* **15**:73-83.
41
42 238 10. **Deacon RMJ, Cholerton LL, Talbot K, Nair-Roberts R, Sanderson DJ, Romberg**
43
44 239 **C.** 2008. Age-dependent and -independent behavioural deficits in Tg2576 mice. *Behav*
45
46 240 *Brain Res* **189**:126-138.
47
48 241 11. **Deacon R.** 2012. Assessing burrowing, nest construction, and hoarding in mice. *Journal*
49
50 242 *of Visualized Experiments : JoVE*, (59):e2607. doi(59), e2607.
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

For questions contact journals@aaas.org

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- 243 12. Ferguson JN, Aldag JM, Insel TR, Young LJ. 2001. Oxytocin in the medial
244 amygdala is essential for social recognition in the mouse. *J Neurosci* **21**:8278-8285.
- 245 13. Filali M, Lalonde R. 2009. Age-related cognitive decline and nesting behaviour in an
246 APPsw/PS1 bigenic model of Alzheimer's disease. *Brain Res* **1292**:93-99.
- 247 14. Filali M, Lalonde R, Rivest S. 2011. Anomalies in social behaviors and exploratory
248 activities in an APPsw/PS1 mouse model of Alzheimer's disease. *Physiology &*
249 *Behavior* **104**: 880-885.
- 250 15. File SE, Andrews NF. 1994. Flumazenil-reversible anxiolytic effects but inactive on
251 [3H]-Ro 15-4513 binding. *Pharmacol Biochem Behav* **48**:223-227.
- 252 16. File SE. 1980. The use of social interaction as a method for detecting anxiolytic activity
253 of chlordiazepoxide-like drugs. *J Neurosci Methods* **6**:219-238.
- 254 17. Gariépy JL, Gendreau PL, Cairns RB, Lewis MH. 1998. D1 dopamine receptors and
255 the reversal of isolation-induced behaviours in mice. *Behav Brain Res* **95**:103-111.
- 256 18. Garner JP, Weisker SM, Dufour B, Mench JA. 2004. Barbering (fur and whisker
257 trimming) by laboratory mice as a model of human trichotillomania and obsessive-
258 compulsive spectrum disorders. *Comp Med* **54**:216-224.
- 259 19. Giacalone E, Tansella M, Valzelli L, Garattini S. 1968. Brain serotonin metabolism
260 in isolated aggressive mice. *Biochem Pharmacol.* **17**:1315-1327.
- 261 20. Hedrich HJ, Bulloch GR. The social behaviour of mice and its sensory control. The
262 handbook of experimental animals. The Laboratory Mice London: ELSEVIER.
263 Academic Press.; 2004. p. 287-298.
- 264 21. Ho JM, Murray JH, Demas GE, Goodson JL. 2010. Vasopressin cell groups exhibit
265 strongly divergent responses to copulation and male-male interactions in mice. *Horm*
266 *Behav* **58**:368-377.

For questions contact journals@aafas.org

- 1
2
3
4 267 22. **Holloway Jr WR, Thor DH.** 1988 Social memory deficits in adult male rats exposed
5
6 268 to cadmium in infancy. *Neurotoxicol Teratol* **10**:193-197.
7
8 269 23. **Ishihama T, Ago Y, Shintani N, Hashimoto H, Baba A, Takuma K.** 2010.
9
10 270 Environmental factors during early developmental period influence psychobehavioural
11
12 271 abnormalities in adult PACAP-deficient mice. *Behav Brain Res* **209**:274-280.
13
14 272 24. **Jones SE, Brain PF.** 1987. Performances of inbred and outbred laboratory mice in
15
16 273 putative tests of aggression. *Behav Genet* **17**:87-96.
17
18 274 25. **Kalueff AV, Minasyan A, Keisala T, Shah ZH, Tuohimaa P.** 2006. Hair barbering
19
20 275 in mice: implications for neurobehavioural research. *Behav Processes* **71**:8-15.
21
22 276 26. **Karelina K, Norman GJ, Zhang N, DeVries AC.** 2009. Social contact influences
23
24 277 histological and behavioural outcomes following cerebral ischemia. *Exp Neurol.*
25
26 278 **220**:276-282.
27
28 279 27. **Keeling LJ, Gonyou HW.** Social behaviour in farm animals. London: CABI
29
30 280 Publishing; 2001.
31
32 281 28. **Kovaacs CE, Gould TD.** 2010. Shock-induced aggression in mice is modified by
33
34 282 lithium. *Pharmacol Biochem Behav* **94**:380-386.
35
36 283 29. **La Barba RC, Martini J, White J.** 1969. The effect of maternal-separation on the
37
38 284 growth of Ehrlich carcinoma in the Balb-c mouse. *Psychosom Med* **31**:129-133.
39
40 285 30. **Lijam N, Paylor R, McDonald MP, Crawley JN, Deng CX, Herrup K.** 1997. Social
41
42 286 interaction and sensorimotor gating abnormalities in mice lacking Dvl1. *Cell Sep*
43
44 287 **90**:895-905.
45
46 288 31. **Linck VM, da Silva AL, Figueiró M, Caramão EB, Moreno PRH, Elisabetsky E.**
47
48 289 2010. Effects of inhaled Linalool in anxiety, social interaction and aggressive behaviour
49
50 290 in mice. *Phytomedicine* **17**:679-683.
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

For questions contact journals@aaas.org

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- 291 32. **Lindzey G, Winston H, Manosevitz M.** 1961. Social dominance in inbred mouse
292 strains. *Nature* **191**:474-476.
- 293 33. **Long SY.** 1972. Hair-nibbling and whisker-trimming as indicators of social hierarchy
294 in mice. *Anim Behav* **20**:10-12.
- 295 34. **Mackawa T, Kim S, Nakai D, Makino C, Takagi T, Ogura H.** 2010. Social isolation
296 stress induces ATF-7 phosphorylation and impairs silencing of the 5-HT 5B receptor
297 gene. *EMBO J* **29**:196-208.
- 298 35. **McGill TE.** 1962. Sexual behaviour in three inbred strains of mice. *Behaviour* **19**:341-
299 350.
- 300 36. **Miczek KA, Weerts E, Haney M, Tidey J.** 1994. Neurobiological mechanisms
301 controlling aggression: Preclinical developments for pharmacotherapeutic interventions.
302 *Neurosci Biobehav Rev* **18**:97-110.
- 303 37. **Mines MA, Yuskaitis CJ, King MK, Beurel E, Jope RS.** 2010. GSK3 influences
304 social preference and anxiety-related behaviours during social interaction in a mouse
305 model of fragile X syndrome and autism. *PLoS One* **5**:e9706-e9706.
- 306 38. **Miyakawa T, Leiter LM, Gerber DJ, Gainetdinov RR, Sotnikova TD, Zeng H.**
307 2003. Conditional calcineurin knockout mice exhibit multiple abnormal behaviours
308 related to schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* **100**:8987-8992.
- 309 39. **Miyakawa T, Yamada M, Duttaroy A, Wess J.** 2001. Hyperactivity and intact
310 hippocampus-dependent learning in mice lacking the M1 muscarinic acetylcholine
311 receptor. *J Neurosci* **21**:5239-5250.
- 312 40. **Moretti P, Bouwknecht JA, Teague R, Paylor R, Zoghbi HY.** 2005. Abnormalities
313 of social interactions and home-cage behaviour in a mouse model of Rett syndrome.
314 *Hum Mol Genet* **14**:205-220.

For questions contact journals@aafas.org

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- 315 41. Mosig DW, Dewsbury DA. 1976. Studies of the copulatory behaviour of house mice
316 (*Mus musculus*). Behav Biol 16:463-473.
- 317 42. Moy SS, Nadler JJ, Young NB, Nonneman RJ, Segall SK, Andrade GM. 2008.
318 Social approach and repetitive behaviour in eleven inbred mouse strains. Behav Brain
319 Res 191:118-129.
- 320 43. Nelson RJ, Demas GE, Huang PL, Fishman MC, Dawson VL, Dawson TM. 1995.
321 Behavioural abnormalities in male mice lacking neuronal nitric oxide synthase. Nature
322 378:383-386.
- 323 44. Nishimori K, Young LJ, Guo Q, Wang Z, Insel TR, Matzuk MM. 1996. Oxytocin is
324 required for nursing but is not essential for parturition or reproductive behaviour. Proc
325 Natl Acad Sci U.S.A. 93:11699-11704.
- 326 45. Pandey DK, Mahesh R, Kumar AA, Rao VS, Arjun M, Rajkumar R. 2010. A novel
327 5-HT(2A) receptor antagonist exhibits antidepressant-like effects in a battery of rodent
328 behavioural assays: approaching early-onset antidepressants. Pharmacol Biochem
329 Behav 94:363-373.
- 330 46. Panksepp JB, Lahvis GP. 2007. Social reward among juvenile mice. Genes Brain
331 Behav 6:661-671.
- 332 47. Pietropaolo S, Delage P, Lebreton F, Crusio WE, Cho YH. 2012. Early development
333 of social deficits in APP and APP-PS1 mice. Neurobiology of Aging 33: 1002.e17-
334 1002.e27.
- 335 48. Rissman EF, Early AH, Taylor JA, Korach KS, Lubahn DB. 1997. Estrogen
336 receptors are essential for female sexual receptivity. Endocrinology 138:507-510.
- 337 49. Rodriguez RM, Chu R, Caron MG, Wetsel WC. 2004. Aberrant responses in social
338 interaction of dopamine transporter knockout mice. Behav Brain Res 148:185-198.

For questions contact journals@naaa.org

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- 339 50. **Romeo RD, Mueller A, Sisti HM, Ogawa S, McEwen BS, Brake WG.** 2003. Anxiety
340 and fear behaviours in adult male and female C57BL/6 mice are modulated by maternal
341 separation. *Horm Behav* **43**:561-567.
- 342 51. **Rondinini C, Venerosi A, Branchi I, Calamandrei G, Alleva E.** 1999. Long-term
343 effects of prenatal 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT) exposure on intermale aggressive
344 behaviour of mice. *Psychopharmacology (Berl)* **45**:317-323.
- 345 52. **Ros-Simó C, Valverde O.** 2012. Early-life social experiences in mice affect emotional
346 behaviour and hypothalamic-pituitary-adrenal axis function. *Pharmacol Biochem Behav*
347 **102**:434-441.
- 348 53. **Sandnabha NK.** 1996. Selective breeding for isolation-induced intermale aggression in
349 mice: associated responses and environmental influences. *Behav Genet* **26**:477-488.
- 350 54. **Scott JP.** 1966. Agonistic behaviour of mice and rats: a review. *Am Zool* **6**:683-701.
- 351 55. **Siegmund A, Wotjak CT.** 2007. A mouse model of posttraumatic stress disorder that
352 distinguishes between conditioned and sensitised fear. *J Psychiatr Res* **41**:848-860.
- 353 56. **Sobottka B, Eggert F, Ferstl R, Müller-Ruchholtz W.** 1989. Changed chemosensory
354 identity following experimental bone marrow transplantation: recognition by another
355 species. *Z Exp Angew Psychol* **36**:654-664.
- 356 57. **Sokolowski MB.** 2010. Social interactions in "simple" model systems. *Neuron* **65**:780-
357 794.
- 358 58. **Spencer CM, Alekseyenko O, Serysheva E, Yuva-Paylor L, Paylor R.** 2005. Altered
359 anxiety-related and social behaviours in the *Fmr1* knockout mouse model of fragile X
360 syndrome. *Genes Brain Behav* **4**:420-430.
- 361 59. **Spiteri T, Musatov S, Ogawa S, Ribeiro A, Pfaff DW, Ágmo A.** 2010. The role of
362 the estrogen receptor α in the medial amygdala and ventromedial nucleus of the

For questions contact journals@aafas.org

- 1
2
3
4 363 hypothalamus in social recognition, anxiety and aggression. Behav Brain Res **210**:211-
5
6 364 220.
7
8 365 60. **Strozik E, Festing MF.** 1981. Whisker trimming in mice. Lab Anim **15**:309-312.
9
10 366 61. **Terranova ML, Laviola G.** 2001. delta-Opioid modulation of social interactions in
11
12 367 juvenile mice weaned at different ages. Physiol Behav **73**:393-400.
13
14 368 62. **Tremolizzo L, Doueiri M, Dong E, Grayson DR, Davis J, Pinna G.** 2005. Valproate
15
16 369 corrects the schizophrenia-like epigenetic behavioural modifications induced by
17
18 370 methionine in mice. Biol Psychiatry **57**:500-509.
19
20 371 63. **Tsunekawa H, Noda Y, Miyazaki M, Yoneda F, Nabeshima T, Wang D.** 2008.
21
22 372 Effects of (R)-(-)-1-(benzofuran-2-yl)-2-propylaminopentane hydrochloride [(*-*)-BPAP]
23
24 373 in animal models of mood disorders. Behav Brain Res **189**:107-116.
25
26 374 64. **Turner LH, Lim CE, Heinrichs SC.** 2007. Antisocial and seizure susceptibility
27
28 375 phenotypes in an animal model of epilepsy are normalized by impairment of brain
29
30 376 corticotropin-releasing factor. Epilepsy Behav **10**:8-15.
31
32 377 65. **Uhrich J.** (1921) 1938 The social hierarchy in albino mice. Journal of Comparative
33
34 378 Psychology **25**:373-413.
35
36 379 66. **Van Heerden JH, Russell V, Korff A, Stein DJ, Illing N.** 2010. Evaluating the
37
38 380 behavioural consequences of early maternal separation in adult C57BL/6 mice; the
39
40 381 importance of time. Behav Brain Res **207**:332-342.
41
42 382 67. **Venerosi A, Valanzano A, Alleva E, Calamandrei G.** 2001. Prenatal exposure to anti-
43
44 383 HIV drugs: neurobehavioural effects of zidovudine (AZT) + lamivudine (3TC)
45
46 384 treatment in mice. Teratology **63**:26-37.
47
48 385 68. **Williams JB, Pang D, Delgado B, Kocherginsky M, Tretiakova M, Krausz T.** 2009.
49
50 386 A model of gene-environment interaction reveals altered mammary gland gene
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

For questions contact journals@aaalas.org

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- 387 expression and increased tumor growth following social isolation. *Cancer Prev Res*
388 (Phila Pa) **2**:850-861.
- 389 69. Yochum CL, Bhattacharya P, Patti L, Mirochnitchenko O, Wagner GC. 2010.
390 Animal model of autism using GSTM1 knockout mice and early post-natal sodium
391 valproate treatment. *Behav Brain Res* **210**:202-210.
- 392 70. Zanettini C, Carola V, Lo Iacono L, Moles A, Gross C, D'Amato FR. 2010.
393 Postnatal handling reverses social anxiety in serotonin receptor 1A knockout mice.
394 *Genes Brain Behav* **9**:26-32.

For questions contact journals@aaas.org

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

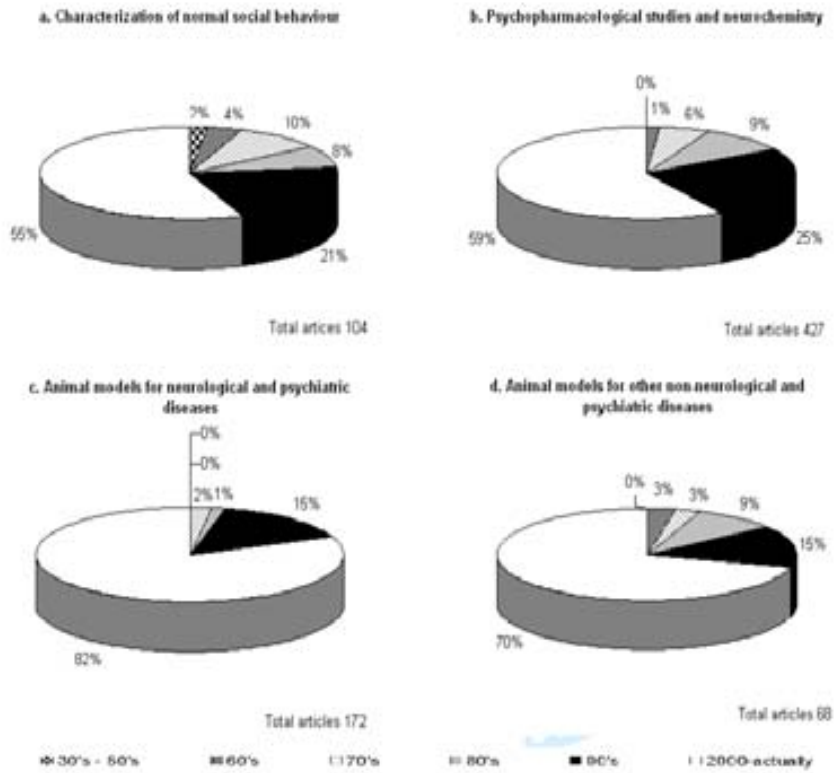


Figure 1. Timeline of scientific publications (1930-2012) about social behaviour in mice for areas basic and translational research. a. Characterization of normal social behaviour; b. Psychopharmacological studies and neurochemistry. c. Animal models for neurological and psychiatric diseases; d. Animal models for other non-neurological and psychiatric diseases.

For questions contact journals@ealms.org

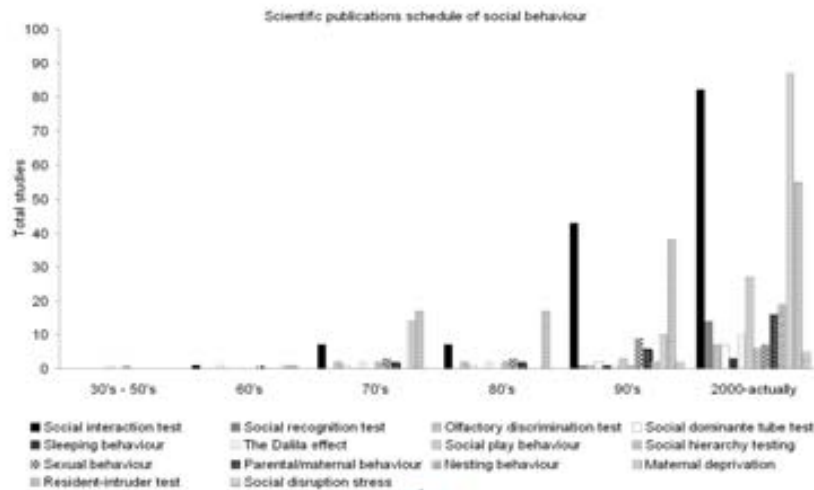


Figure 2. Timeline of scientific publications (1930-2012) about social behaviour in mice according to type test. Spontaneous social behaviour studies in dyads (social interaction test, social recognition test, olfactory discrimination test, tube-dominance test, sexual behaviour and nesting behaviour) or in group (sleeping behaviour, Dalila effect, social hierarchy test, parental/maternal behaviour, social play behaviour) and social induced isolated behaviour studies (resident-intruder test, social disruption stress, maternal deprivation).

For questions contact journals@aaas.org

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Social behaviour test	Biological functions and psychology elements relates	Scientific publications representatives
Social interaction (SIT)	<i>Anxiety</i>	4,16,62,67
Social recognition (SRT)	<i>Learning and memory</i>	12,22,59
Olfactory discrimination (ODI)	<i>Learning and memory</i>	49,56
Dominance tube (DTT)	<i>Aggressivity</i>	30,32,60
Sleeping behaviour (SB)	<i>Social aggregation: sleep phase</i>	30
The Dalila Effect (DE)	<i>Anxiety</i>	18,25,33
Social hierarchy (SHT)	<i>Aggressivity</i>	5,49,65
Sexual behaviour (SB)	<i>Reproductive</i>	35,41,48
Parental behaviour (PB)	<i>Reproductive</i>	4,7,44
Nesting behaviour (NB)	<i>Reproductive</i>	10,11
Isolation-induced (II)	<i>Aggressivity</i>	19,54,8,9,36,
Resident-intruder (RIT)	<i>Aggressivity</i>	24,36,40,43
Disruption stress (SDR)	<i>Aggressivity</i>	1,2
Maternal deprivation (MD)	<i>Emotional</i>	29,50,66
Play behaviour (SPB)	<i>Psychomotor-cognitive development</i>	46,51

Table 1. Reference reviews (1930-2012) of scientific studies about social behaviour in mice. Principal test for measure social behaviour and representative literature.

For questions contact journals@aalas.org

Diseases and interest areas	Murine animal model	Test	Scientific publications representatives
<i>Rett Syndrome</i>	Swiss CD-1	SIT	61
	RIT (Mecp2 ^{308/Y}) and I29/SvEv WT	SIT, RIT, DTT	40
<i>Schizophrenia</i>	Calcineurin (CN) Knockout	SIT	39
	Homozygous PACAP	SIT, RIT	23
<i>Fragile X Syndrome</i>	Fmr1 Knockout	SIT, RIT	58
	Fmr1 Knockout	SIT	37
<i>Epilepsy</i>	E1 and ddY	SIT	64
<i>Anxiety disorder</i>	C57BL/6N (B6N) and C57BL/6J0la (B6J0la)	SIT	55
	Heterozygous Htr1a knockout	SIT, PB, RIT	70
<i>Depression</i>	ddY	SIT, SB	63
	Albino	SIT	45
<i>Alzheimer's disease</i>	Tg2576	NB	10
	APPsw/PS1	NB	13
			14
			47
<i>Autism</i>	10 inbred strains: AKR/J, C57BL/6J, C58/J, DBA/2J, FVB/NJ, NOD/Lj, NZB/BINj, PL/J, SJL/J, and SWR/J	SIT	42
	GSTM1 Knockout	SIT	69
<i>Cerebral ischemia</i>	C57/BL6	II	26
<i>Cancer's disease</i>	C3(1)/SV40 T-antigen	SIT	68
<i>Huntington's disease</i>	7 inbred strains: 129S1/SvImJ (129S1), A/J (A), BALBcBy/J (CBY), C57BL/6J (B6), TBTBR + tf/J (BTBR), DBA/2J (D2), and FVB/NJ (FVB)	SIT	3
<i>Aggressivity</i>	C57BL/6J	RIT, SB	21
	C57BL/6J and FVB/NJ	DTT, II	28
<i>Pharmacology and drugs</i>	CD-1	SIT	12
	CF1 albino	SIT, RIT	31
<i>Dopamine receptor</i>	ICR	SIT, II	17
<i>Acetylcholine receptor</i>	M1R ^{-/-} M1 muscarinic	SIT	38
<i>Glutamate receptor</i>	mGluR7 ^{-/-} and mGluR7 ^{+/+}	SIT	6
<i>Serotonin receptor</i>	C57BL/6 congeneric	II	34

Table 2. Representative examples of the use of mouse models in studies of social behaviour and their psychological bases, neurochemistry, modeling of neurological disorder, psychiatric and other diseases.

For questions contact journals@aaas.org

