

Factors de risc en la malaltia d'Alzheimer: Estudis en animals triple transgènics 3xTg-AD

Raquel Baeta Corral

TESI DOCTORAL



Universitat Autònoma
de Barcelona

Bellaterra, 2014

Factors de risc en la malaltia d'Alzheimer: Estudis en animals triple transgènics 3xTg-AD

TESI DOCTORAL DE

Raquel Baeta Corral

^a Unitat de Psicologia Mèdica, Departament de Psiquiatria i Medicina Legal; ^b Institut de Neurociències
Universitat Autònoma de Barcelona

Aquest treball s'ha realitzat sota la direcció de la Dra Lydia Giménez Llort i forma part del projecte ISC3 PI10/00283 finançat per l'Institut de Salut Carlos III. Raquel Baeta Corral ha rebut una beca predoctoral de *Formació de Personal Investigador* de la Generalitat de Catalunya FI-DGR (2012FI_B1 00198). Tesi adscrita a l'Institut de Neurociències dins del programa de Doctorat en Neurociències, trienni 2011-2014.

Vist-i-plau de la interessada

Vist-i-plau de la directora

Raquel Baeta Corral

Dra. Lydia Giménez Llort
Professora Agregada i Investigadora

Dpt. de Psiquiatria i Medicina Legal i Institut de Neurociències
Universitat Autònoma de Barcelona.

Bellaterra, 2014

Agraïments

Encara recordo el dia que vaig arribar al departament de Psiquiatria i Medicina Legal i vaig entrevistar-me amb la que a dia d'avui és la meva directora de tesi. Com a coordinadora del Màster de Neurociències m'havia de reunir amb ella per decidir en quin grup d'investigació realitzaria el meu projecte de recerca i després de parlar una estona em va dir, "Què et semblaria quedar-te aquí?" No ho vaig dubtar. I d'aquesta conversa ja fa cinc anys.

Així és com va començar aquesta etapa que mai oblidaré i que, gràcies als esforços i a les empentes de companys, amics i familiars en els moments clau, em sento molt satisfeta d'haver dut a terme.

En primer lloc, i sense cap mena de dubte, vull agrair a la meva directora de tesi, la Dra. Lydia Giménez Llort, l'oportunitat de formar part del seu projecte d'investigació i, especialment, tot el suport, els ànims i la confiança que ha dipositat en mi durant tots aquests anys.

També vull donar les gràcies a tots els meus companys del laboratori, especialment a la Denise, pel seu optimisme i per l'ajuda durant la primera fase experimental, a l'Ismael per la seva disposició i amabilitat i, a la Virginia i a l'Aida, pel suport i els ànims durant aquests últims mesos.

Al Dr. Carles Saura, per donar-me l'oportunitat de col·laborar en el projecte d'investigació MEMOSAD i als companys del laboratori de bioquímica, per la bona acollida i especialment l'Arnaldo, per tota l'ajuda i dedicació.

I com no, a la meva família, sobretot als meus pares per haver-me recolzat en tots els projectes que m'he plantejat en la vida i per estar sempre al meu costat.

A l'Ivan, per la comprensió, la paciència, i per fer-me veure les coses sempre des d'un punt de vista positiu.

I als meus amics, per preguntar-me sempre com ho portava i donar-me ànims, i en particular a l'Ivan, pel suport i per les llargues converses sobre el present i el sobre què ens presentarà el futur.

Finalment, vull donar les gràcies a les fonts de finançament, ja que gràcies a elles són les que faciliten l'avenç en la investigació. En aquest sentit, els estudis que componen aquesta tesi han estat recolzats per l'Institut de Salut Carlos III, ISC3 PI10/00283, Espanya i Xarxa Envel·liment i Fragilitat, RD06/0013/0003, així com, el grup d'investigació 'Behavioral Neuroscience' el qual és membre de 'Animal

and Human Models in Mental Disorders' reconegut com 2009-SGR-0051 per la Generalitat de Catalunya. Al consorci europeu COST-Action, per finançar l'estada i el curs "The face of pain in dementia: Facts and fables of pain in patients with impaired cognition" celebrat a Amsterdam, Països Baixos durant aquest passat mes de març. També a la Generalitat de Catalunya per haver-me atorgat una beca predoctoral FI-DGR.

I per suposat, als ratolins, ja que ens faciliten el coneixement i aporten llum per al descobriment de nous horitzons en l'àmbit de la recerca bàsica. Els animals utilitzats en aquesta tesi doctoral provenen de la colònia de ratolins homozigots 3xTg-AD i NTg-WT establerts per la Dra Lydia Giménez-Llort a la Universitat Autònoma de Barcelona, Espanya, a partir de progenitors amablement proporcionats pel professor Frank M. LaFerla, Departament de Neurobiologia i Conducta, de la Universitat de Califòrnia Irvine, Califòrnia, EUA. Tots els procediments s'han dut a terme d'acord amb la legislació 2010/69/EU en relació amb la cura i ús d'animals per a mètodes experimentals i compleixen les pautes ARRIVE desenvolupades per les NC3Rs (Kilkenny *et al.*, 2010).

Llistat d'abreviacions

Abreviacions estàndards

3xTg-AD	ratolins triple transgènics per a la malaltia d'Alzheimer
β A	pèptid beta-amiloide
ACTH	hormona adrenocorticotropa, en anglès <i>adrenocorticotropic hormone</i>
AD	malaltia d'Alzheimer, en anglès <i>Alzheimer's disease</i>
AGE	producte final de glicosilació avançada, en anglès <i>advanced glycosilation endproduct</i>
ApoE	apolipoproteïna E
APP	proteïna precursora amiloide
BBB	barrera hematoencefàlica
BLA	amígdala basolateral
BPSD	Síntomes Comportamentals i Psicològics associats a la Demència, en anglès <i>Behavioral and Psychological Symptoms of Dementia</i>
Caff	cafeïna
CRH	hormona alliberadora de corticotropina, en anglès <i>corticotropic releasing hormone</i>
CS	estimulació cognitiva, en anglès <i>cognitive stimulation</i>
DA	dopamina
DLA	activitats de la vida diària, en anglès <i>daily life activities</i>
D-gal	D-galactosa
DMII	diabetis mellitus tipus II
DLB	demència amb cossos de Lewis, en anglès <i>Dementia with Lewy Bodies</i>
DSM-IV TR	manual diagnòstic i estadístic dels trastorns mentals
EE	enriquiment ambiental, en anglès <i>environmental enrichment</i>
EOAD	malaltia d'Alzheimer d'aparició primerenca, en anglès <i>early onset Alzheimer's disease</i>
FAD	malaltia d'Alzheimer de tipus familiar
FDA	Administració d'aliments i medicaments, del departament de salut i servei humà dels Estats Units d'Amèrica: <i>U.S. Food and Drug Administration, United States Department of Health and Human Services.</i>
fEPSP	potencial excitatori postsinàptic, en anglès <i>field excitatory postsynaptic potential</i>

FTD	demència frontotemporal
HPA	eix hipotalàmic-pituitari-adrenal
<i>i.p.</i>	intraperitoneal
LCR	líquid cefaloraquídi
LOAD	malaltia d'Alzheimer d'aparició tardana, en anglès <i>late onset Alzheimer's disease</i>
LTP	potenciació a llarg termini, en anglès <i>long-term potentiation</i>
MAPT	proteïna tau associada a microtúbuls, en anglès <i>microtubule associated protein tau</i>
MCI	deteriorament cognitiu lleu, en anglès <i>Mild Cognitive Impairment</i>
mg/Kg	mil·ligrams/kilogram
NMDA	N-metil-D-aspartat
NTg	ratolins no-transgènics
PH	handling postnatal
PND	dia postnatal
PS1	gen de la presinilina 1
PS2	gen de la presinilina 2
ROS	espècies reactives d'oxigen, en anglès <i>reactive oxygen species</i>
<i>s.c.</i>	subcutani
VaD	demència vascular
veh	vehicle
WAT	teixit adipós blanc, en anglès <i>white adipose tissue</i>

Abreviacions paràmetres comportamentals

ACT	test de l'activitat motora, en anglès <i>motor activity test</i>
CT	test de les cantonades, en anglès <i>corner test</i>
DLB	caixa fosca/clara, en anglès <i>dark/light box</i>
EA	braços tancats, en anglès <i>enclosed arms</i>
EPM	laberint elevat en creu, en anglès <i>elevated-plus maze</i>
FI	ingesta de menjar, en anglès <i>food intake</i>
HB	taula dels forats, en anglès <i>hole-board</i>
LD	llum/foscor, en anglès <i>light/dark</i>
MBT	test d'enterrament de marbres o <i>marble test (MBT)</i>

LW	pèrdua de pes, en anglès <i>loss of weight</i>
MWM	laberint aquàtic de Morris, en anglès <i>Morris water maze</i>
OA	braços oberts, en anglès <i>open arms</i>
OF	camp obert, en anglès <i>open field</i>
SA	estiraments d'aproximació, en anglès <i>stretch attendance</i>
SMT	test sensoriomotor, en anglès <i>sensoriomotor test</i>
TFT	test de la sacsejada de la cua, en anglès <i>tail flick test</i>
TM	laberint en T, en anglès <i>T-maze test</i>

CONTINGUTS

1. Resum	9
2. Introducció	13
2.1 Complexitat clínica de la malaltia d'Alzheimer	13
2.2. Nocicepció en la malaltia d'Alzheimer	16
2.3 Factors de risc en la malaltia d'Alzheimer	17
2.4 Estratègies preventives i terapèutiques	20
2.5 Recerca a nivell preclínic	28
2.5.1 Models animals de l'AD	28
2.5.2 El model murí 3xTg-AD de l'AD	36
2.6 Estratègies preventives i terapèutiques en recerca preclínica	37
2.6.1 Estratègies no-farmacològiques	37
2.6.2 Estratègies farmacològiques	40
2.7 Nocicepció en la recerca preclínica	47
3. Objectius	51
4. Materials i Mètodes	55
4.1 Animals	55
4.2 Programació de la cria	55
4.3 Tractaments	56
4.4 Estudis conductuals	57
4.5 Estadística	64
5. Estudi I. Caracterització de les conductes bizarres i la valoració del risc en ratolins 3xTg-AD i NTg	
5.1 Disseny experimental	67
5.2 Resultats	68
5.3 Discussió	75
5.4 Conclusions	79
6. Estudi II. Fase 1. Caracterització de les estratègies de navegació en el laberint aquàtic de Morris en ratolins 3xTg-AD i NTg	
6.1 Disseny experimental	83
6.2 Resultats	84
6.3 Discussió	92

6.4 Conclusions	94
7. Estudi II. Fase 2. Valoració dels efectes conductuals del tractament crònic amb cafeïna en ratolins 3xTg-AD i NTg	
7.1 Disseny experimental	97
7.2 Resultats	98
7.3 Discussió	114
7.4 Conclusions	119
8. Estudi III. Caracterització conductual de l'administració crònica amb D-galactosa en ratolins mascles i femelles c57bl/6	
8.1 Disseny experimental	123
8.2 Resultats	124
8.3 Discussió	134
8.4 Conclusions	137
9. Aportacions de la tesi i conclusions generals	141
10. Referències bibliogràfiques	147
11. Annexos	175

1. Resum

El principal factor de risc en la malaltia d'Alzheimer (AD), la demència senil més freqüent, és l'edat i presenta major incidència en el gènere femení. En la seva aparició, se li atribueixen també altres factors de risc, tant biològics (genètics i no genètics) com ambientals. La seva forma familiar heretada genèticament (FAD), que es presenta en menys del 5% dels casos, i l'espòrànica, majoritària i d'etiologia desconeguda, acostumen a mostrar un patró temporal diferent pel que fa a l'edat d'inici i la taxa de progressió del procés neurodegeneratiu. Per tant, es classifiquen també com a AD d'aparició primerenca (edat d'inici < 65 anys), i AD d'aparició tardana (edat d'inici > 65 anys), respectivament. Tot i això, el fet que comparteixin els mateixos símptomes clínics cognitius i els conductuals i psicològics associats a la demència (BPSD) així com processos neuropatològics subjacents, ha permès a nivell experimental, la utilització de models animals de tipus genètic portadors dels transgens humans per a l'avenç en l'estudi de la malaltia.

Els ratolins 3xTg-AD (PS1_{M146V}, APP_{Swe} i tau_{P301L}), creats pel laboratori de Laferla (UCI, USA, 2003), que desenvolupen de forma progressiva els trets neuropatològics β A i tau característics de la malaltia, amb un perfil temporal i neuroanatòmic similar al que es presenta en els pacients, han estat els subjectes experimentals d'aquesta tesi doctoral. En l'Estudi I, aquest model animal ha permès estudiar l'impacte del factor genètic i del gènere en l'expressió de les conductes bizarres, fins ara no caracteritzades, com a part del seu patró de tipus BPSD primerenc als 6 mesos d'edat. Alhora, en aquest primer estudi, s'han avaluat els efectes beneficiosos a llarg termini d'una estimulació ambiental de tipus sensorial tàctil administrada durant l'ontogènia: el handling postnatal. El tractament va reduir en els dos genotips, no transgènic (NTg) i 3xTg-AD, la conducta de petrificació i, especialment en les femelles, les conductes bizarres desenvolupades en el test del camp obert. D'altra banda, va potenciar la conducta de valoració del risc en la caixa fosca/clara. Finalment, el handling va exercir efectes selectius, actuant sobre les 'estratègies per fer front a l'estrès' en aquestes proves conductual ansio-gèniques sense modificar l'activitat exploratòria *per se*.

Tenint en compte que la cafeïna exerceix efectes farmacològics estimulants però també ansio-gènics i que els efectes d'aquest hàbit de vida són més acusats en els homes que en les dones, s'ha volgut verificar si els efectes cognitius que ara se li atribueixen en vers a la malaltia serien extensibles si existeix un perfil BPSD accentuat com el

que mostra aquest model animal. Els resultats de l'Estudi II van demostrar que el tractament oral crònic amb una dosi baixa de 0,3mg/Kg de cafeïna iniciat als 6 mesos d'edat (inici dels símptomes cognitius i BPSD) va modificar a llarg termini la major part de les conductes avaluades als 13 mesos d'edat (inici de les fases avançades de la malaltia). En concret, la cafeïna va incrementar la neofòbia i altres conductes del perfil ansiós, que en el cas del model 3xTg-AD es va traduir en un agreujament del seu patró BPSD. També va alterar el ritme circadià en els animals 3xTg-AD, incrementant l'activitat motora. La caracterització d'estratègies de navegació va permetre definir patrons d'aprenentatge i memòria distintius entre els dos genotips (3xTg-AD: natació en cercles i estratègies mixtes i no dirigides; NTg: presència de flotació i estratègies úniques i dirigides) que van ser millorats per la cafeïna. Les variables clàssiques de latència i distància no van mostrar efectes beneficiosos, probablement per la interferència de la hiperactivitat dels 3xTg-AD i els efectes estimulants de la cafeïna en els NTg.

Finalment, donat que l'edat és el principal factor de risc per a desenvolupar l'AD de tipus esporàdic, es va estudiar un model farmacològic d'envelliment accelerat basat en l'increment de l'estrès oxidatiu induït per l'administració crònica *s.c.* de 100mg/Kg de D-galactosa durant 56 dies. En ratolins d'ambdós gèneres de la soca c57bl/6, els efectes només es van observar a nivell d'equilibri en els mascles i en la coordinació motora en ambdós gèneres. Per contra, la D-galactosa va mostrar efectes positius dosi dependents (0-50-100mg/Kg) en altres dimensions com l'activitat exploratòria en els mascles, les conductes bizarres en les femelles així com algunes tasques d'aprenentatge i memòria de forma dependent del gènere. Aquesta caracterització dels efectes dosi resposta del tractament crònic amb D-galactosa ha permès definir el disseny experimental per a estudis posteriors en ratolins 3xTg-AD utilitzant la dosi de 100mg/Kg com a model d'envelliment i la de 50mg/Kg com a potencialment protectora. Alhora, aquesta dualitat d'efectes de la D-galactosa fa que resulti també interessant en l'estudi de l'envelliment i altres malalties neurodegeneratives.

Per la seva transcendència translacional en l'estudi del dolor en pacients amb dèficit cognitiu i/o demència, en l'apartat d'annexos s'inclouen resultats preliminars que indiquen que els ratolins 3xTg-AD mostren la mateixa resposta de la sacsejada de la cua en aigua freda que els animals NTg, i que es veu alentida en tots dos genotips per l'edat.

Introducció

2. Introducció

Durant les últimes dècades, els processos neurodegeneratius i les demències han despertat un especial interès tant en la vessant de la recerca bàsica com en la clínica. Un informe de la OMS publicat l'any 2012 indicava que en el món hi ha uns 35,6 milions de persones que pateixen demència i, cada any es registren 7,7 milions de casos nous. El DSM-IV-TR (APA, 2000) distingeix diversos tipus de demència, de les quals els subtipus més comuns en ordre de freqüència són la de tipus Alzheimer (AD), la demència vascular (VaD), la demència amb cossos de Lewy (DLB) i la demència frontotemporal (FTD). No obstant, altres poden ser les causes del desenvolupament de la demència, com per exemple, les causades per traumatisme cranial o per altres malalties mèdiques, com la malaltia de Parkinson, la malaltia de Huntington, la malaltia de Pick, entre d'altres. Particularment, la demència tipus Alzheimer, és una malaltia neurodegenerativa que afecta aproximadament al 2% de la població en els països desenvolupats i s'espera que aquestes xifres puguin arribar a quadruplicar-se durant els pròxims 40 anys (Brookmeyer *et al.*, 2006).

Aquest treball d'investigació de recerca bàsica, en el model murí triple transgènic 3xTg-AD per a la malaltia d'Alzheimer, s'emmarca dins de l'estudi a nivell conductual dels diferents factors de risc que influeixen en l'aparició i progressió de la malaltia, així com la valoració dels efectes beneficiosos d'estratègies preventives i/o terapèutiques basades en hàbits i estils de vida.

2.1 Complexitat clínica de la malaltia d'Alzheimer

Després que Alois Alzheimer descrivís per primera vegada els símptomes de la malaltia que més tard portaria el seu nom, gran part de la recerca s'ha centrat en l'estudi dels aspectes moleculars i neuropatològics, així com els dèficits cognitius característics associats a aquesta malaltia.

A nivell clínic, la progressió de la malaltia d'Alzheimer es divideix en diferents estadis definits segons el grau de severitat i/o freqüència de símptomes en els pacients, sobretot aquells relacionats amb la funció cognitiva. Seguint aquests criteris s'han establert les següents fases: una primera fase anomenada preclínica, assintomàtica; una fase de deteriorament cognitiu lleu (en anglès *mild cognitive impairment*, MCI); una fase moderada; i finalment, una fase severa de la malaltia. Es sospita que el pacient es troba en un estadi de MCI quan comença la

pèrdua de memòria, per exemple, oblida noms i té dificultat per recordar on són les coses. A més, en aquest estadi és possible que s'observin els primers canvis de personalitat. Quan hi ha greus alteracions en les capacitats cognitives, com per exemple, la incapacitat de reconèixer cares familiars, es diu que el pacient es troba en un estadi moderat de la malaltia. Alhora, en aquest estadi, és freqüent que algunes de les activitats de la vida diària, com vestir-se, es vegin compromeses. També és possible que el pacient experimenti al·lucinacions o paranoies i que manifesti un comportament agressiu. En darrer lloc, en l'estadi sever, la malaltia està tan avançada que els pacients no són conscients del seu entorn i tenen moltes dificultats per dur a terme tasques vitals com parlar, menjar o tenir cura de sí mateixos. Encara que, a dia d'avui, un diagnòstic segur només es pugui fer *post mortem*, existeixen diferents vies com la punció lumbar per obtenir mostres del líquid cefaloraquídi (LCR), tècniques d'imatge cerebral i la valoració neurofisiològica. Segons el DSM (APA, 2000) l'AD es caracteritza per un conjunt d'alteracions progressives, moltes d'elles relacionades amb el funcionament cognitiu, que són suficientment severes com per causar greus problemes en l'àmbit social i/o professional. Els pacients pateixen dèficits de memòria tant anterògrada, (basada en la capacitat d'aprendre nova informació) com retrògrada (recordar informació anteriorment apresada) i, com a mínim, alguna dels següents alteracions: afàsia (problemes en la parla), apràxia (disminució de les capacitats per dur a terme activitats motores), agnòsia (incapacitat de reconèixer o identificar objectes) i alteracions en les funcions executives (planificació, organització, seqüenciació).

D'altra banda, els símptomes neuropsiquiàtrics associats a la demència també són bastant prevalents entre els pacients de l'AD (Reisberg *et al.*, 1987). La seva importància recau en el fet que són la font principal de patiment dels pacients i alhora provoquen una càrrega física i mental per a la família i per als professionals (Tan *et al.*, 2005). D'ençà, a nivell clínic, s'han establert escales de valoració d'aquests símptomes, als quals també se'ls refereix com Síntomes Comportamentals i Psicològics associats a la Demència (SCPD o en anglès i a partir d'ara, BPSD –Behavioral and Psychological Symptoms of Dementia–). D'entre el gran ventall de BPSD associats a l'AD, els símptomes psicòtics, com poden ser els deliris, al·lucinacions o els patrons motors aberrants i, d'altra banda, els emocionals, com l'agitació i la irritabilitat, l'ansietat o l'apatia són els BPSD amb més incidència entre els pacients de l'AD, ja es trobin tant en una fase mitja com avançada de la malaltia (Shimabukuro *et al.*, 2005). Estudis observacionals indiquen que la presència i/o severitat d'aquests BPSD poden estar

influenciats pels factors edat i gènere (Steinberg *et al.*, 2006; Zuidema *et al.*, 2009; Karttunen *et al.*, 2011) i alhora, alguns d'ells augmenten en freqüència i/o severitat amb la progressió de la malaltia (Piccininni *et al.*, 2005). Altres factors rellevants que poden influenciar en el desenvolupament de BPSD són la comorbiditat mèdica, determinats dèficits neuropsicològics o problemes en la percepció (Steinberg *et al.*, 2006; García-Alberca *et al.*, 2010). A causa d'aquesta variabilitat i heterogeneïtat, és imprescindible que a l'hora d'avaluar aquests símptomes es tingui en compte l'historial clínic, però també les experiències subjectives del pacient i els informes detallats dels professionals i cuidadors responsables (Ford, 2014). De fet, existeixen més d'una trentena d'escala de classificació validades que, d'una manera senzilla, donen una visió objectiva de la naturalesa i del grau de severitat del problema. En la pràctica clínica, les escales més freqüentment utilitzades són les anomenades 'Inventori Neuropsiquiàtric' (Neuropsychiatric Inventory, NPI) (Cummings *et al.*, 1994) i 'Síntomes Comportamentals en la Malaltia d'Alzheimer' (Behavioral Symptoms in Alzheimer's Disease, BEHAVE-AD) (Reisberg *et al.*, 1987) ja que són dues de les escales que comprenen un ampli espectre de BPSD i que inclouen, per a cada símptoma, la puntuació de variables com la freqüència, la severitat i el patiment per al cuidador.

Per últim, el deteriorament de les funcions executives i activitats de la vida diària (DLA), juntament amb alguns dels BPSD, com les conductes bizarres, sovint prenen un segon terme en el camp de la investigació, malgrat ser els primers signes de la malaltia d'Alzheimer i comportar una gran càrrega per als pacients i cuidadors (Reisberg *et al.*, 1987). Ara bé, en els darrers anys, s'està prenent consciència d'aquesta problemàtica i, cada vegada més, els estudis clínics on s'avaluen estratègies terapèutiques no es limiten als seus efectes sobre la pèrdua de memòria, sinó que també busquen beneficis sobre els BPSD i les DLA (Littbrand *et al.*, 2011).

2.2 Nocicepció en la malaltia d'Alzheimer

El tractament del dolor en les persones amb demència és un problema crític ja que la incidència en els pacients és del 20-60%. Concretament, en els pacients d'Alzheimer s'estima que és de les més altes, amb una incidència gairebé del 60% (Pautex *et al.*, 2006). Durant els últims anys, s'estan utilitzant tècniques psicofísiques i de neuroimatge que ajuden a comprendre millor el processament del dolor en el cervell, així com per identificar els canvis estructurals i funcionals en la malaltia d'Alzheimer. Però la interpretació de la complexa relació entre la patologia de l'AD, l'activació cerebral, i els informes en relació a la percepció del dolor és encara un repte a dia d'avui. Tot i que la major part de la literatura referent al dolor descriuen les xarxes lateral (sensorial) i medial (afectiva) com les principals vies de transmissió i codificació del dolor, existeixen evidències que donen suport a una xarxa de dolor rostral addicional, que es creu que participa en la producció de les conductes relacionades amb el dolor (revisat per Monroe *et al.*, 2012). La percepció emocional o afectiva del dolor, avaluada a través de l'informe verbal i de la visualització de la conducta, es pot veure modificada en l'AD (Schmidt *et al.*, 2010). S'ha vist que els pacients amb AD tenen un menor nombre de components relacionats amb el dolor afectiu (Scherder *et al.*, 1999; Scherder i Bouma, 2000) i una alta tolerància a aquest tipus de dolor (Benedetti *et al.*, 1999) en comparació amb la gent d'avançada edat sense demència, i que no es deu a una pèrdua de la memòria al dolor (Scherder *et al.*, 2001). Això succeeix perquè la majoria de les àrees del sistema del dolor medial estan afectades en els pacients d'AD mentre que gran part del sistema del dolor lateral es veu preservat fins a les darreres etapes de la malaltia (Scherder *et al.*, 2003; Cole *et al.*, 2006). A més, els circuits neuronals que intervenen la percepció del dolor i l'expressió del comportament poden ser hiper- o hipoactius, depenent de la regió del cervell involucrada, de l'estadi de la malaltia, i del tipus de dolor (estímuls experimentals aguts o condicions mèdiques cròniques). Les persones amb un estadi moderat a sever de l'AD, per tant, poden experimentar dolor, però ser incapaços d'indicar el dolor a través d'informes verbals o de comportament, el que els deixa en gran risc d'experimentar dolor sense tractar. Les aproximacions psicofísiques (verbals o conductuals) i neurofisiològiques (activació cerebral) poden abordar les mancances que actualment existeixen en el coneixement de processament del dolor en l'AD i revelar la relació entre els processos neuronals i els resultats verbals i comportamentals en presència de dolor agut o crònic.

2.3 Factors de risc en la malaltia d'Alzheimer

La malaltia d'Alzheimer tipus familiar (FAD), que representa el 1-5% de tots els casos es classifica també segons l'edat d'inici en AD d'aparició primerenca (*-early onset Alzheimer's disease- EOAD*, edat d'inici < 65 anys), mentre que l'AD esporàdica, la qual representa > 95% dels afectats, és d'aparició tardana (*-late onset Alzheimer's disease- LOAD*, edat d'inici > 65 anys).

Encara que clínicament són indistingibles, la FAD està generalment associada amb una taxa més ràpida de la progressió i amb un patró d'herència mendeliana. Tres gens (APP, PS1 i PS2) que codifiquen proteïnes implicades en la degradació de l'APP i generació de β A, han estat fermament implicats en la fisiopatologia de la FAD. Mutacions lligades a l'AD a aquests tres gens presenten una alta penetrància (>85%), són majoritàriament d'herència autosòmica dominant, i condueixen cap a l'agregació de β A i a la malaltia d'inici primerenc. En canvi, els gens implicats en l'augment del risc de l'AD esporàdic no segueixen un patró d'herència mendeliana. En aquests casos, el risc esperat de patir la malaltia es duplica en els familiars directes de pacients amb AD esporàdic comparat amb la resta de població sense aquests antecedents genètics. A més, es produeixen més casos de LOAD en bessons monozigòtics que en bessons dizigòtics, el que suggereix una contribució genètica substancial del 60-80% per a aquesta malaltia.

Per als casos de LOAD, d'entre els factors fins ara descrits en la literatura com a causants de l'aparició de la malaltia d'Alzheimer, la presència tant de factors de risc biològics (genètics i no genètics) com ambientals són els responsables de l'aparició de dita malaltia.

La presència de factors de risc genètics contribueixen a l'aparició de la malaltia d'Alzheimer, com és el cas del gen de l'apolipoproteïna E (ApoE), concretament la forma al·lèlica ApoE ϵ 4. En la població blanca no-caucàsica, el fet de tenir un al·lel ApoE ϵ 4 està associat amb un increment del risc de 2 a 3 vegades de patir Alzheimer, mentre que si es tenen les dues còpies al·lèliques, el risc incrementa fins a 5 vegades o més (Kuusisto *et al.*, 1994). A més, aquest gen també se l'ha relacionat amb el MCI (Sasaki *et al.*, 2009) i amb la progressió del MCI cap a l'AD (Petersen *et al.*, 1995; Ramakers *et al.*, 2008; Barabash *et al.*, 2009; Blom *et al.*, 2009). Dels gens coneguts que es relacionen amb l'aparició de l'AD, l'al·lel ApoE ϵ 4 es relaciona amb aproximadament el 40% dels casos de l'AD de tipus esporàdic. No obstant, altres gens relacionats amb l'aparició de l'AD són els gens de la presinilina 1

(PS1) i presinilina 2 (PS2), en el 22% dels casos, mentre que, en menor mesura, els gens trobats gràcies als estudis d'associació de genoma complet (GWAS) (5%) i l'APP (<1%). Tot i els grans avenços, actualment encara es desconeixen les causes d'aparició de l'AD en la meitat dels casos (Pericak-Vance i Haines, 2009).

Tal i com succeeix en altres malalties com el càncer, la diabetis o les malalties cardiovasculars, dins dels factors biològics no genètics, l'edat és el principal factor de risc. Això afegeix una complexitat en l'estudi dels possibles mecanismes implicats en la malaltia d'Alzheimer. Tanmateix, certes malalties que comporten factors de risc vascular com ara la hipertensió, la diabetis, l'obesitat i la hiperlipidèmia són també considerats factors de risc per a l'AD, alhora que comorbiditats. Als efectes negatius que la hipertensió té sobre la integritat vascular de la barrera hematoencefàlica (BBB) (Kalaria, 2010) s'hi afegeixen possibles danys cel·lulars, una disminució en la funció neuronal o sinàptica, apoptosi i, fins i tot, un augment de la deposició de β A (Deane *et al.*, 2004). L'augment del risc de patir AD en pacients de diabetis mellitus tipus II (DMII) es postula, de fet, a una associació indirecta, ja que realment la DMII comporta un augment del risc de patir accidents cerebrovasculars, els quals alhora disminueixen el nivell llindar de β A necessari per causar danys cognitius (Arvanitakis *et al.*, 2006). D'altra banda, la hiperinsulinèmia associada a la DMII és l'altre fenomen que relaciona a la DMII amb l'AD ja que l'insulina pot travessar la BBB i, en la vellesa, la infusió d'insulina perifèrica incrementa la deposició de β A i la fosforilació de tau en el cervell (Park, 2001). En relació a l'obesitat, estudis realitzats en pacients diabètics, on l'obesitat és un fet freqüentment observable (Adebisi i Oghagbon, 2003), s'ha vist que aquesta està associada amb la hiperinsulinèmia. Així doncs, en individus amb obesitat, la predisposició a desenvolupar Alzheimer es podria veure incrementada per la hiperinsulinèmia. Finalment, cada vegada hi ha més estudis que suggereixen que alts nivells lipídics en sang, entre els quals s'inclou el colesterol, incrementa el risc de patir Alzheimer ja que aquest augmenta la producció de β A en determinades àrees cerebrals, com per exemple, en l'hipocamp. Així doncs, l'ús de fàrmacs per reduir el colesterol, com les estatines, mostren una disminució de patir AD (Wolozin *et al.*, 2000; Puglielli *et al.*, 2003; Ejsing *et al.*, 2006) ja que redueixen els nivells de colesterol i tenen propietats antiinflamatòries (Borenstein *et al.*, 2006).

S'han identificat factors ambientals que influeixen el risc de patir Alzheimer. Dins d'aquest grup es troben la dieta, l'exercici físic o el

nivell educatiu. D'entre els hàbits alimentaris, un consum calòric elevat o dietes riques en greixos saturats poden contribuir en el risc de patir un increment del dany cognitiu en persones d'edat avançada (Morris *et al.*, 2004). A més, s'ha vist que alguns casos clínics de MCI estan relacionats amb un consum elevat de greixos saturats (Eskelinen *et al.*, 2008). Les dietes amb alts nivells de colesterol també comporten un increment del risc ja que produeixen efectes adversos en el sistema cardiovascular, però també durant els darrers anys s'ha demostrat que participa directament en la cascada amiloide, mitjançant la potenciació del processament amiloidogènic de l'APP (Pappolla *et al.*, 2003). No obstant, la hipòtesi sobre si el colesterol és un factor que pugui causar AD és encara objecte de debat a dia d'avui (revisat per Wood *et al.*, 2014).

Juntament amb la dieta, la manca d'activitat física té un efecte important sobre el desenvolupament de l'AD. Alguns estudis epidemiològics realitzats durant els darrers anys han demostrat que un nivell baix d'activitat física contribueix al desenvolupament de malalties cròniques en la gent d'edat avançada, on s'inclouen malalties coronàries, accidents cerebrovasculars, diabetis, càncer, i també, l'Alzheimer (Solfrizzi *et al.*, 2008, Chen *et al.*, 2014). Alhora, la manca d'activitat física combinada amb uns hàbits nutricionals deficientes contribueixen a augmentar l'índex d'obesitat en la població de més edat (revisat per Elsayw i Higgins, 2010), és a dir, poden generar un dels factors de risc anteriorment mencionats.

Un baix nivell educatiu també juga un paper clau en el risc del desenvolupar Alzheimer i altres demències. Així ho demostren estudis epidemiològics, on les persones d'edat avançada amb menor nivell educatiu mostraven una major incidència de demència que les persones amb alt nivell (Petrosini *et al.*, 2009). La reserva cognitiva, tant estructural com funcional induïda pel procés educatiu, té un impacte clar en la capacitat d'esmoreir els efectes del dany cognitiu.

Per tant, hi ha una gran varietat de factors que contribueixen al desenvolupament de la malaltia d'Alzheimer esporàdica i, probablement, la combinació de diversos d'aquests factors, la que en sigui la responsable. El fet d'entendre com actuen aquests factors o com modifiquen els processos neuropatològics i les alteracions neurofisiològiques subjacents, condueix a la millora de les estratègies preventives i terapèutiques per a la malaltia. Als fàrmacs i vacunes s'incorporen altres estratègies que consideren la importància de canvis en la dieta i en l'estil de vida.

2.4 Estratègies preventives i terapèutiques

Estratègies preventives

La càrrega mundial de la malaltia d'Alzheimer que es preveu en les pròximes dècades (Brookmeyer *et al.*, 2007) exigeix considerar seriosament el potencial de les estratègies preventives per retardar la seva aparició o frenar la seva progressió. Els esforços s'han de fer per reduir la seva prevalença i incidència ja que les estratègies que pretenen modificar els processos subjacents a la malaltia han resultat insuficients per enfrontar el seu impacte (revisat per Anand *et al.*, 2014). D'altra banda, es considera que les interaccions complexes entre la càrrega genètica i les experiències de vida guarden relació amb les vies que ens allunyen o acosten a l'AD (Mattson, 2004). Tot i que la genètica juga un paper important en la determinació de la capacitat intel·lectual, hi ha nombrosos factors que intervenen en el procés d'envelliment natural que redueix la probabilitat de desenvolupar demència (Daffner, 2010). No només l'educació, sinó també les activitats socials, físiques i cognitives estimulants es troben entre els que es consideren factors d'estil de vida protectors i modificables de la malaltia, que resulten ser molt prometedors. Diversos estudis de metanàlisis han indicat que l'estil de vida es correlaciona amb el retard en l'aparició del MCI i una menor incidència de l'AD, encara que alguns altres estudis mostren discrepàncies.

Programes d'estimulació

Tot i que existeix una varietat considerable entre els estudis, l'estimulació cognitiva (en anglès, *cognitive stimulation CS*) mostra un efecte global positiu, especialment en el domini cognitiu tan en individus sans com pacients d'AD. L'evidència d'aquests estudis i el fet que contribueixen a una millor comprensió de la fisiopatologia de l'AD ha portat a idear formes de CS com a mesures preventives i terapèutiques per a les malalties neurodegeneratives basats en nous mares de l'estructura cerebral, la funció i la connectivitat (revisat per De Marco, 2014). Múltiples modalitats d'estimulació cognitiva s'han dissenyat i provat en persones que es troben en un estadi prodròmic de la malaltia d'Alzheimer, com per exemple, la rehabilitació cognitiva, donant resultats molt esperançadors (Moro *et al.*, 2014). A més d'aquestes modalitats d'estimulació cognitiva, els programes d'estimulació física o l'estimulació ambiental/sensorial també formen part del conjunt d'estratègies preventives. D'una banda, la pràctica voluntària regular d'exercici físic és reconeguda mundialment com a

una de les estratègies que formen part un estil de vida saludable (OMS, 2010). Nombrosos estudis epidemiològics realitzats durant els darrers anys indiquen que el fet d'adquirir un estil de vida actiu millora l'estat físic i mental alhora que pot reduir el risc de patir certes malalties. Pel que fa a l'AD, estudis recents indiquen els múltiples efectes beneficiosos d'aquest hàbit de vida, ja que disminueix alguns aspectes neuropatològics, com els nivells de β A i la fosforilació de la tau en l'hipocamp, incrementa els nivells de BDNF i, alhora que és capaç de millorar-ne alguns símptomes, com el dèficit cognitiu. També millora la plasticitat sinàptica hipocàmpica (LTP), estimula la neurogènesi, la glicogènesi i l'angiogènesi, i presenta efectes neuroprotectors en el cervell (revisat per Phillips *et al.*, 2014). D'altra banda, el grau de socialització també té el seu paper dins del risc a desenvolupar algun tipus de demència (revisat per Jedrzejewski *et al.*, 2014). De fet, tant l'estimulació cerebral com la socialització són importants en la plasticitat cerebral. Per exemple, estudis realitzats en pacients amb AD lleu a moderada que van participar en intervencions de socialització durant més d'un any, indiquen que durant aquest període no va haver una disminució del funcionament cognitiu en els pacients (Arkin, 2007). D'altres, duts a terme també en persones d'edat avançada han obtingut resultats prometedors. Concretament, el fet d'utilitzar recursos socials, que inclouen per exemple, les xarxes socials i la participació en activitats socials, van mostrar potencial per reduir el deteriorament cognitiu (Barnes *et al.*, 2004; Holtzman *et al.*, 2004; Crooks *et al.*, 2008).

Dieta

En l'última dècada, el nombre d'estudis que demostren la capacitat de la dieta per modificar el risc de l'AD ha augmentat considerablement en paral·lel a l'afermament de la hipòtesi d'un augment de l'estrès oxidatiu en les malalties neurodegeneratives. Estudis recents han evidenciat que una dieta hipocalòrica, rica en antioxidants i àcids grassos mono- i poliinsaturats està associada a una disminució de la incidència de l'AD (Solfrizzi *et al.*, 2006; Gu *et al.*, 2010) independentment del nivell d'activitat física (Scarmeas *et al.*, 2009) i de la comorbiditat vascular (Scarmeas *et al.*, 2006). Estudis *in vitro* mostren una reducció tant de la peroxidació lipídica associada a β A com de l'apoptosi mitjançant l'acció antioxidant de la vitamina E (Butterfield *et al.*, 2002), la vitamina C i els carotens (Pitchumoni i Doraiswamy, 1998). Altres suggereixen que el consum d'antioxidants pot reduir el risc a patir l'AD perquè disminueixen el risc de patir accidents cerebrovasculars (Vokó *et al.*, 2003). A més de reduir l'estrès

oxidatiu, els àcids grassos poliinsaturats tenen efectes beneficiosos sobre funcions neuronals i vasculars i en processos inflamatoris (Yehuda *et al.*, 2002). Tot i això, hi ha resultats que creen discrepàncies, per exemple, alguns estudis no mostren resultats tan positius, ja que no s'ha pogut demostrar una associació directa entre els efectes de les dietes suplementades amb vitamina E i àcids grassos poliinsaturats i la millora de la capacitat cognitiva (Kang *et al.*, 2006; Chiu *et al.*, 2008). D'altra banda, la cafeïna està sorgint com un agent protector enfront de la progressió de la malaltia però també davant els dèficits associats al propi l'envelliment (Marques *et al.*, 2011). De fet, el consum crònic de cafeïna també ha demostrat tenir efectes beneficiosos, com pot ser la potenciació tant de les capacitats físiques com psíquiques, alhora que també se l'ha relacionat amb la disminució del risc a patir algunes malalties (veure Cunha i Agostinho, 2010). Per tant, cal tenir en compte el potencial de la cafeïna com un modulador epigenètic i les conseqüències que podria tenir per a aplicacions preventives i terapèutiques en l'AD.

La cafeïna (1-3-7-trimetilxantina), l'estimulant més extensament consumit en el món, es troba en begudes i menjars comuns com el cafè, el te, refrescos de cola i la xocolata. Gairebé el 90% de la població dels països desenvolupats consumeixen cafeïna i el seu consum mitjà mundial està estimat en 70mg/persona/dia, encara que en certs països com Suècia és superior als 400mg/persona/dia (revisat per Fredholm *et al.*, 1999). A nivell fisiològic, en els humans, la concentració plasmàtica màxima de cafeïna s'assoleix als 30-60 minuts després del seu consum i té una vida mitja al voltant de 4 hores (Fredholm *et al.*, 1999). El consum de cafeïna pot provocar alteracions de diverses funcions fisiològiques, com la locomoció, els patrons de la son o les funcions cardiovasculars (Fredholm *et al.*, 1999, 2007).

A nivell molecular, la cafeïna és un antagonista competitiu dels receptors d'adenosina (Fredholm, 1980; Fredholm *et al.*, 1999), i actua majoritàriament sobre els receptors A₁ i A_{2A} (Fredholm *et al.*, 1999) (veure figura I).

Els efectes de la cafeïna depenen la durada del tractament i de la dosi administrada. Breument, els principals efectes del tractament agut de cafeïna són l'estimulació de la freqüència cardíaca i el patró bifàsic característic de l'activitat motora (Fredholm *et al.*, 1999). L'acció estimulante es pot veure a dosis baixes (Fredholm *et al.*, 2001), importants perquè són similars a les consumides diàriament pels humans, mentre que els efectes depressors s'observen a dosis altes (Daly i Fredholm, 1988). D'altra banda, els tractaments crònics poden

tenir diversos efectes i sobretot dependran de la dosi administrada. En els humans, un consum de cafeïna elevat (igual o superior a 4 tasses de cafè diàries) s'ha associat a problemes d'ansietat i depressió. En general, l'ús perllongat de dosis altes de cafeïna provoca alteracions en l'estat d'ànim, a més de complicacions físiques, com poden ser problemes cardiovasculars, alteracions del son, migranyes, entre d'altres (revisat per Higdon i Frei, 2006). Ara bé, dosis baixes de cafeïna (20-200mg/dia) s'associen amb efectes subjectius positius en l'estat d'ànim: benestar, confiança, motivació, alerta, vigilància, eficiència, concentració i desig de sociabilització (veure Griffiths *et al.*, 1990; Silverman *et al.*, 1994). Si bé és cert que aquest conjunt de sensacions sobre l'estat anímic ha estat descrit en molts estudis, l'efecte potenciador de la cafeïna sobre les capacitats cognitives encara és objecte de debat a dia d'avui. Probablement, aquesta controvèrsia entre els resultats es degui a la variabilitat metodològica emprada entre els diferents laboratoris, ja que determinats factors poden influir en els resultats, fet que dificulta l'obtenció de conclusions definitives (revisat per Cunha, 2008). La importància de conèixer els efectes de la cafeïna sobre la cognició recau en el fet que existeixen indicis que apunten que la seva ingesta sembla limitar o prevenir la progressió algunes malalties neurodegeneratives i altres trastorns crònics com la diabetis o certs tipus de càncer. Per tant, el consum de cafeïna no només respon a un hàbit de vida sinó que també cal tenir en compte que moltes investigacions actuals estan centrades en el possible ús profilàctic i/o terapèutic de la cafeïna en certes malalties.

Tal i com s'ha mencionat en apartats anteriors, l'envelliment és un altre factor que s'ha correlacionat amb l'aparició i la progressió de l'AD. Malgrat que encara es desconeixen els processos propis de l'envelliment, l'ús de la cafeïna per tractar dèficits cognitius associat a l'envelliment natural o al patològic, com en l'AD, mostra resultats prometedors. De fet, el seu paper com a possible agent protector es basa en la seva acció farmacològica bloquejant el receptor d'adenosina A₂A, el qual mostra una expressió i funció aberrant en l'envelliment i en les patologies relacionades (Marques *et al.*, 2011). En aquest sentit, un estudi fet pel "Cardiovascular Risk Factors, Aging and Dementia" (CAIDE) indica que el consum de 3-5 tasses de cafè diàries en la població de mitjana edat s'associa, en el 65% dels casos, amb un menor risc de desenvolupar demència en un futur (Eskelinen *et al.*, 2009).

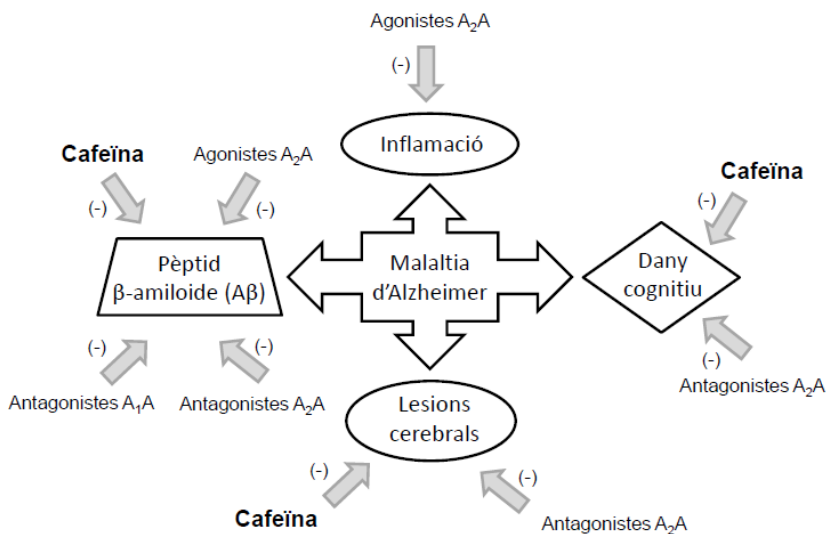


Figura I. Esquema dels mecanismes d'acció de la cafeïna i altres antagonistes i agonistes dels receptors d'adenosina A_1 i A_2A en la malaltia d'Alzheimer (Rivera-Oliver i Díaz-Ríos, 2014). (-) inhibició. Els efectes beneficiosos de la cafeïna reportats tenen relació amb el seu ampli espectre d'actuació. Com es pot observar en la figura, la cafeïna i altres tipus de antagonistes A_2A , són fàrmacs psicoestimulants que actuen inhibint des de processos moleculars, com l'increment de la producció/agregació del pèptid βA ; cel·lulars, com les lesions cerebrals; fins a funcionals, com el dany cognitiu; tots ells característics de l'AD.

Estratègies terapèutiques

En els pacients, malgrat la gran quantitat d'esforços dedicats a trobar una cura o un alleujament de l'AD, només hi ha dos tipus de fàrmacs aprovats per l'agència FDA que intenten pal·liar el procés neurodegeneratiu i el declivi cognitiu associat: els inhibidors de la acetilcolinesterasa i els moduladors dels receptors N-metil-D-aspartat (NMDA). Tot i això, existeixen altres estratègies terapèutiques, com la immunoteràpia, els fàrmacs per reduir el colesterol, els inhibidors de la BACE, etc. (veure figura II). La majoria dels enfocaments terapèutics estan centrats en fer front al declivi cognitiu característic a la malaltia, i durant els últims anys, s'ha avançat en el tractament neuropsiquiàtric paral·lel dels símptomes psicològics i conductuals associats a la demència. Alhora, el desenvolupament i l'aplicació d'estratègies no-

farmacològiques combinades amb la teràpia farmacològica clínicament pautada contribueixen en la millora simptomatològica.

Estratègies terapèutiques farmacològiques

En el decurs de les fases preclíniques a clíniques, tot i els resultats prometedors de molts de fàrmacs amb seguretat i eficàcia demostrada en estudis preclínics, més del 90% de candidats han fallat en els assaigs clínics (Anand *et al.*, 2014). De fet, malgrat dels més de 1.200 assaigs clínics relacionats amb l'AD registrats en el ClinicalTrials.gov, actualment, només cinc són els fàrmacs aprovats per la FDA per al tractament de l'AD: els inhibidors de la acetilcolinesterasa (donepezil, rivastigmina, galantamina i tacrina) i els moduladors dels receptors N-metil-D-aspartat (NMDA) (memantina). Aquests fàrmacs tracten els símptomes de l'AD amb eficàcia variable però no alenteixen la progressió de la malaltia (Buckholtz, 2001; Mangialasche *et al.*, 2010). Concretament, els fàrmacs inhibidors de l'ACHe actuen incidint sobre la disponibilitat d'acetilcolina, tant facilitant la disposició del substrat com bloquejant la seva degradació, potenciant la neurotransmissió colinèrgica que està afectada en la malaltia (Scarpini *et al.*, 2003). La galantamina i rivastigmina milloren les capacitats cognitives en alguns pacients amb MA lleu a moderada (Farlow *et al.*, 2000; Raskind *et al.*, 2000; Wilcock *et al.*, 2003; Kavanagh *et al.*, 2011) mentre que el donepezil és l'únic fàrmac dins dels inhibidors de la AChE, amb eficàcia demostrada en un estadi de l'AD de moderada a greu (Rogers i Friedhoff, 1996; Reisberg *et al.*, 2003). D'altra banda, la memantina, antagonista dels receptors NMDA pel glutamat, fa front a la hipòtesi glutamatèrgica de l'AD (Butterfield i Pocernich, 2003) i s'utilitza en fases moderades a avançades de la malaltia, encara que tampoc impedeix la seva progressió (Martínez-Coria, *et al.*, 2010).

Un altre tipus d'estratègies terapèutiques són les teràpies immunològiques, que estan enfocades a l'estabilització de la malaltia, gràcies a les quals s'està aconseguint reduir o eliminar els dipòsits de β A (Schenk *et al.*, 1999; Oddo *et al.*, 2004; Billings *et al.*, 2005; Kitazawa *et al.*, 2009). D'altra banda, l'ús de neurolèptics de tipus haloperidol té com a objectiu el tractament dels BPSD, en concret de les conductes agressives, els símptomes psicòtics i l'agitació. Per a la simptomatologia ansiosa i afectiva (depressiva) associada a la malaltia es prescriuen les benzodiazepines i/o els antidepressius.

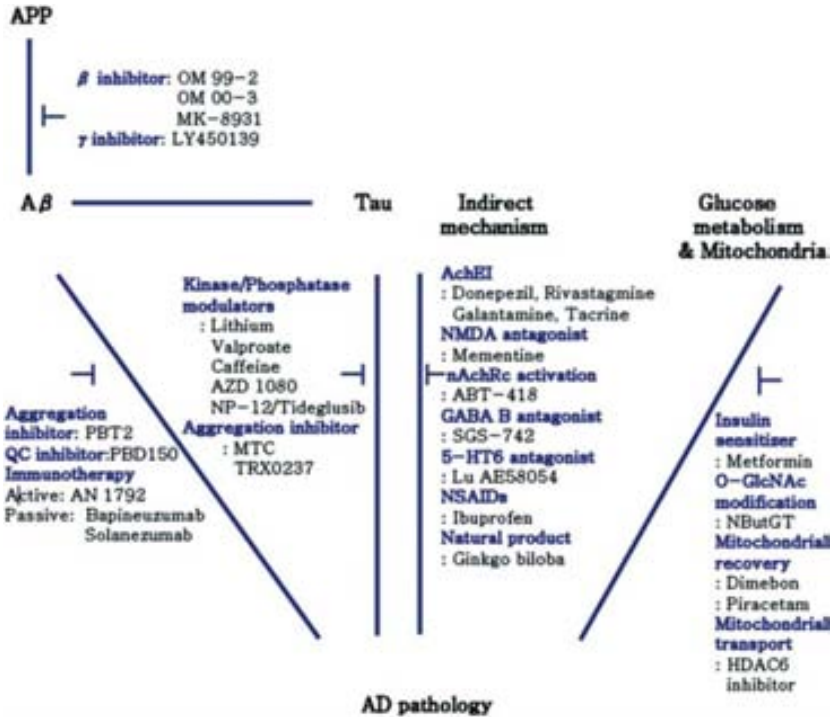


Figura II. Diverses estratègies terapèutiques AD i els exemples de productes químics provats en estudis preclínic o clínics (Han i Mook-Jung, 2014). APP, proteïna precursora amiloide; Aβ, β amiloide; QC, glutaminil ciclasa; AChEI, Inhibidors d'acetilcolinesterasa; nAChRc, receptor nicotínic d'acetilcolina; 5-HT6 Rc, receptor 5-hidroxitriptamina 6; AINES, fàrmacs antiinflamatoris no esteroïdals; O-GlcNAc, O-ligada β-N-acetilglucosamina; NButGT, 1, 2-didesoxi-2'-propil-α-D-glucopiranos-[2,1-d]-Δ²-tiazolina; HDAC, desacetilació d'histones.

Estratègies terapèutiques no-farmacològiques

Clínicament, les intervencions no-farmacològiques es consideren que actuen com a coadjuvants. Per tal d'aplicar l'estratègia que millor s'adapti a l'etapa de la malaltia i a la mesura de les necessitats dels pacients, cal que prèviament es dugui a terme una avaluació exhaustiva dels factors que puguin estar afectant als símptomes. No només es té en compte el pacient sinó també el cuidador i l'entorn, així com les relacions existents entre aquests tres elements. Exemples

d'intervencions específiques inclouen la teràpia de reminiscència, i altres teràpies basades en l'entrenament cognitiu, experiències estimulants com la musicoteràpia, la teràpia Snoezelen/multisensorial o l'aromateràpia, i finalment, programes socials i la pràctica regular d'activitat física. La manipulació ambiental pot incloure la reducció de l'estimulació sensorial, la senyalització adequada, l'eliminació dels miralls i els canvis en l'entorn visual (Livingston *et al.*, 2005). També hi ha un grup d'estratègies terapèutiques no-farmacològiques conegudes com intervencions actives que van dirigides a l'entorn més proper del pacient, és a dir, als cuidadors. Estudis recents han examinat el paper d'algunes d'aquestes intervencions, com per exemple, programes d'educació o d'entrenament per a l'adquisició o millora d'habilitats en els cuidadors, la planificació de les activitats i el disseny de l'entorn, entre d'altres. Els resultats indiquen un efecte global positiu en la relació pacient-cuidador amb la pràctica d'aquestes estratègies (Brodaty i Arasaratnam, 2012). En conjunt, el propòsit d'aquestes estratègies és ajudar a mitigar els efectes neuropsiquiàtrics ajudant a reduir la contenció farmacològica (Hugues, 2011).

En aquest ampli marc de possibles d'estratègies preventives i terapèutiques, els models animals i els estudis translacionals cobren importància en tant que permeten estudiar la malaltia des d'un punt de vista multidisciplinar i que consideri la neurodegeneració, la disfunció cognitiva i els trastorns conductuals BPSD, trets característics de la malaltia.

2.5 Recerca a nivell preclínic

2.5.1 Models animals de l'AD

En el camp de recerca bàsica i del descobriment de nous fàrmacs per a l'AD, els models animals esdevenen recursos essencials per al descobriment de mecanismes biològics, la validació de dianes moleculars i la selecció de compostos potencials que ajudin a trobar la cura per a l'AD.

En les darreres dues dècades s'ha desenvolupat un ampli ventall de models animals. Els principals objectius en la majoria d'aquests models són, d'una banda, reproduir els aspectes neuropatològics característics de l'AD, i de l'altra, establir-ne una correlació amb la funció cognitiva. Segons la via per al qual s'hagin obtingut, es poden classificar en models intervinguts, models naturals o models genèticament modificats segons es detalla a continuació:

Models intervinguts: L'administració de substàncies farmacològiques o químiques en el cervell o la inducció de lesions en regions cerebrals específiques pot replicar alguns dels trets característics de l'AD. Molts models impliquen la introducció de pèptid βA en el cervell d'espècies com la rata (Nakumura *et al.*, 2001) o el macacos rhesus (Li *et al.*, 2010). Encara que aquests models emulen alguns dels signes clínics, no repliquen tots els aspectes de la patologia (Duyckaerts *et al.*, 2008). Altres models intervinguts químicament inclouen l'amnèsia induïda per escopolamina, la inducció de la inflamació amb endotoxines o la interferència amb el metabolisme cerebral (Van Damm i de Deyn, 2011); models que, malgrat les seves limitacions en quant a l'especificitat de la lesió i la conseqüent evolució de la malaltia, han jugat un paper clau en l'enteniment de la funció de sistema colinèrgic en la cognició (Ebert i Kirch, 1998), els mecanismes neuronals subjacents a la disfunció de la memòria (Castañé *et al.*, 2010) o la comprensió de la inflamació, neurotoxicitat, la neurodegeneració i la funció sinàptica (Frautschy *et al.*, 2001) (veure taula I).

Models naturals: De manera espontània, algunes espècies animals com ossos polars, gossos, gats, cabres i ovelles i alguns primats no humans han desenvolupat alguns trets neuropatològics relacionats amb l'AD (Van Dam i De Deyn, 2011). Particularment, en els últims anys, els gossos, lèmurs i el macacos rhesus han esdevingut una potent eina de treball ja que manifesten una deposició βA intraneuronal lligada a l'edat i, en el cas dels gossos, han respòs a determinats tractaments (Cotman i Head, 2008). No obstant, no totes les estratègies farmacològiques aplicades en aquest model caní han esdevingut

satisfactòries en la seva aplicació en humans (Check, 2002; Fillenbaum *et al.*, 2005) (veure taula I).

Models genèticament modificats: Gràcies a l'avenç tecnològic i a la enginyeria genètica, s'han dissenyat diversos models animals que reproduïxen una o més d'una de les característiques neuropatològiques de la malaltia d'Alzheimer de tipus familiar. Els ratolins han estat amb diferència els models transgènics més utilitzats i, gràcies a ells, actualment s'utilitzen com a eina per desvetllar l'etiologia de la malaltia i proporcionen facilitats en el descobriment de noves teràpies. Els primers models murins es van obtenir mitjançant la transfecció de la proteïna mutant humana precursora amiloide (APP) que emulava la producció i deposició de βA similar a la dels humans (Games *et al.*, 1995). mentre que els models posteriors s'han basat en les mutacions de PS1 (Duff *et al.*, 1996), mutacions de tau (Lewis *et al.*, 2000) o una combinació de dos o tres mutacions (Holcomb *et al.*, 1998; Lewis *et al.*, 2001; Oddo *et al.*, 2003a). Els models murins més utilitzats es detallen en la taula II i s'amplien més detalladament en el següent apartat.

i) Ratolins transgènics per a l'APP

En aquests models s'ha trobat un augment dels nivells cerebrals de βA_{42} , formant dipòsits de plaques βA i lesions oxidatives en el cervell similars a les trobades en humans. En canvi, en cap d'aquests models s'han trobat cabdells neurofibril·lars ni pèrdua neuronal, excepte el model APP23. Els models més utilitats són:

Ratolí PDAPP: És el primer ratolí transgènic amb dipòsits cerebrals de βA que es va donar a conèixer. Està basat en la sobreexpressió de proteïna precursora amiloide humana (APP_h) contenint la mutació V717F sota el control del promotor PDGF (Games *et al.*, 1995). El dipòsit anòmal de βA s'inicia al voltant dels 6-9 mesos d'edat en diverses àrees cerebrals, com en l'hipocamp i en l'escorça frontal. La quantitat de dipòsits de βA augmenta amb l'edat, i cap als 12 mesos s'observen nombrosos dipòsits tant difusos com compactes en regions selectivament vulnerables en l'AD humana. En canvi, no s'observen cabdells neurofibril·lars i la mort neuronal no es dona fins als 18 mesos d'edat (Irizarry *et al.*, 1997a). El fenotip clínic d'aquest ratolí és complex, ja que es demostren alteracions tant a nivell basal (p.ex. com és el cas d'anomalies en un laberint radial als 3 mesos de edat) previ a l'aparició de dipòsits de βA , com associades a l'edat, (p.ex. increment d'alteracions amb l'edat en tests de reconeixement d'objectes i l'aparició dels dipòsits de βA) (Dodart *et al.*, 1999a). Als 3 mesos,

aquest ratolí presenta també alteracions en la transmissió sinàptica i hipometabolisme en determinades àrees cerebrals. Aquestes disfuncions s'accentuen amb l'edat donant lloc a una pèrdua de sinapsis funcionals (Larson *et al.*, 1999) i dèficits metabòlics en noves àrees cerebrals, com el còrtex i l'hipocamp (Dodart *et al.*, 1999b) en els animals més vells.

Ratolí Tg2576: Els ratolins transgènics Tg2576 sobreexpressa APP contenint la doble mutació Swedish (K670N, M671L) sota el control del promotor de la proteïna del prió de hámster (Hsiao *et al.*, 1996). Aquests animals desenvolupen dèficits de memòria i aprenentatge associats a l'edat i amb l'aparició de plaques de βA en àrees límbiques i corticals, que s'inicia entorn dels 12 mesos d'edat (Hsiao *et al.*, 1996). De forma semblant al ratolí PDAPP, les plaques compactes s'acompanyen d'una resposta astrocítica i microglial (Irizarry *et al.*, 1997b; Frautschy *et al.*, 1998) així com de la presentació de tau hiperfosforilada en les neurites adjacents i fenòmens d'estrès oxidatiu (Pappolla *et al.*, 1998, Smith *et al.*, 1998). Malgrat això, en aquests ratolins tampoc s'ha trobat pèrdua neuronal o sinàptica significativa (Irizarry *et al.*, 1997b). Els estudis conductuals i electrofisiològics mostren l'existència de dèficit cognitiu que apareix de forma progressiva en el temps a mesura que els animals envelleixen. Així, els ratolins Tg2576 tenen una memòria de referència espacial normal en el laberint de Morris als 3 mesos d'edat, però mostren dèficit als 9-10 mesos (Hsiao *et al.*, 1996).

Ratolí APP23: Aquest transgènic expressa la isoforma 751 de la hAPP contenint la doble mutació Swedish (KM670 / 671NL) sota el control del promotor de Thy-1 murí. Aquest model desenvolupa plaques de βA compactes al còrtex i a l'hipocamp al voltant dels 6 mesos d'edat amb una angiopatia amiloide associada. A més, presenta una pèrdua neuronal en la regió CA1 de l'hipocamp als 14-18 mesos d'edat (Sturchler-Pierrat *et al.*, 1997).

Ratolí TgCRND8: Aquest ratolí porta tant la doble mutació Swedish com la mutació Indiana (hAPP695 K670N, M671L i V717F). Aquest model es va dissenyar per expressar les dues mutacions d'APP, sota el control d'un prió-promotor de hámster. El transgènic mostra una deposició accelerada de βA i, a més, es desenvolupen plaques cap als 3 mesos d'edat, és a dir, en estadis més inicials que altres models APP (Chishti *et al.*, 2001).

Ratolins APP Arc i APPDutch: Ratolins que expressen APP amb la mutació Dutch que produeix una severa angiopatia cerebral associada als dipòsits de β A (Herzig *et al.*, 2004; Ronnback *et al.*, 2011).

ii) Ratolins transgènics per a la presinilina

Les mutacions PS1 o PS2, característiques per la inducció d'un augment dels nivells $A\beta_{42}$ sense la formació de placa (Oyama *et al.*, 1998) mostren un deteriorament cognitiu modest (Lalonde *et al.*, 2003a, 2003b) però presenten alteracions en la homeostasi del calci en el reticle endoplasmàtic. A més, s'ha demostrat que el transgèn per a la mutació PS1 humana altera el transport axonal i, fins i tot, indueix hiperfosforilació de tau (Lazarov *et al.*, 2007).

iii) Ratolins doble transgènics per a la APP i PS1

Aquest model presenta un ràpid desenvolupament de la formació de plaques comparat amb el model PS1. A nivell conductual mostra alteracions en les tasques d'aprenentatge espacial als 15 mesos d'edat (Bizon *et al.*, 2007). No obstant, aquest model té les seves limitacions, ja que malgrat ser un model para la amiloïdosis, gairebé no presenta pèrdua neuronal ni cabdells neurofibril·lars.

iv) Ratolins transgènics per tau

La proteïna tau és una fosfoproteïna que pertany a la família de les proteïnes tau associades a microtúbuls (MAPT) que s'uneix a la tubulina i facilita la polimerització del túbul (Cleveland *et al.*, 1977). Les mutacions del gen tau són conegudes per generar demència frontotemporal lligada al cromosoma 17 (Götz i Ittner, 2008). Existeixen diversos models animals aconseguits a partir de la mutació de tau, tots ells desenvolupen cabdells neurofibril·lars però alguns d'ells presenten alteracions motores i d'altres, trastorns patològics en el tronc cerebral i la medul·la espinal. A nivell conductual, comparteixen similituds amb el model APP/PS, el que indica que existeix també un dèficit en el transport axonal (Wirhns *et al.*, 2006)

v) Ratolins doble transgènics per a la APP i tau

Aquest model obtingut a partir de la combinació de APP_{swe}/PS1 (Lewis *et al.*, 2001) presenta un fenotip i una patologia accelerada, amb dipòsits de β A superiors al model Tg2576 (APP_{swe}) però sense neurodegeneració. A més, la taxa de mortalitat és elevada.

vi) Ratolins triple transgènics 3xTg-AD

Aquest model es troba àmpliament detallat en la següent secció que porta per títol “1.5.2 El model murí 3xTg-AD de l’AD”.

Taula I. Models no-transgènics de l'AD (Puzzo *et al.*, 2014)

Non-transgenic mouse models of Alzheimer's disease.										
Model	Description	Outcome	Plaques	NFTs	Neuron loss	Synaptic deficits	Memory deficits	Notes	Example	References
Acute Aβ injection	Direct infusion of Aβ into the brain (e.g. dorsal hippocampi, lateral ventricles)	Acute local Aβ elevation	NO	NO	NO	YES	YES	Aβ source/preparation/conformation is crucial	Cell-derived Aβ, Aβ dimers from human brain, 200 nM synthetic Aβ oligomers	Walsh et al. (2002); Shankar et al. (2008); Puzzo et al. (2012); Wattersson et al. (2013); Fiorito et al. (2013) [21,30,32-34]
Acute tau injection	Direct infusion of tau into the brain (e.g. dorsal hippocampi)	Acute local tau elevation	NO	NO	NO	YES	YES	Different tau isoforms can be used, as well as naturally-derived tau from brain extracts	Tau oligomers from human brain, recombinant tau oligomers	Moe et al. (2008, 2009, 2010, 2010); Lasagna-Reeves et al. (2012) [71,101-104]
Aged animal models	Aged mice, rats, dogs, non-human primates	Natural age-related deficits	YES (dogs, non-human primates)	NO	NO	YES	YES	Exhibit cognitive deficits, brain hypometabolism, cholinergic deficits, altered calcium homeostasis, oxidative stress, neophobia	Aged mice (>18-20 months old)	Galagher et al. (1993); Govner et al. (1993) [72,73]
Senescence-accelerated prone mice (SAMP8)	Spontaneously mutated inbred mouse strain	Shortened lifespan and accelerated aging phenotype; elevated levels of endogenous APP and Aβ	NO	NO	NO	YES	YES	Some tau hyperphosphorylation along with decreased spine density and synaptic proteins; increased gliosis and oxidative stress	SAMP8	Yagi et al. (1968); Okuma et al. (1998) [74,75]

Taula II. Models transgènics de l'AD (Puzzo *et al.*, 2014).

Model	Description	Outcome	Plaques	MTs	Neuron loss	Synaptic deficits	Memory deficits	Years	Example	References
Single transgenic: APP (Swedish)	Mutations at β -secretase cleavage site (A4 G70V)	Enhanced cleavage by β -secretase; over all more A β (all forms)	YES; 9-12mo	NO	NO	YES	YES	Mostly dense cored plaques, some low hyperphosphorylation. Synaptic and memory defects generally precede amyloid deposits	Tg2576 (Swedish)	Hsiao <i>et al.</i> (1996) [54]
APP (Indiana, London)	Mutations at gamma-secretase cleavage site (A4 F71)	Enhanced cleavage by gamma-secretase; enhanced A β 42:40 ratio	YES; 9-12mo	NO	NO	YES	YES	Higher levels of diffuse amyloid deposits	FGAPP (Indiana)	Games <i>et al.</i> (1995) [55]
APP (Arctic, Dutch, Flemish, Italian)	Mutations within APP sequence (A4 E22G, A4 E22V)	Altered APP cleavage; reduced A β secretion; formation of oligomers (A4 E22G)	YES; 9-12mo	NO	NO	YES	YES	Reduced cerebral amyloid neuropathy	TgAPP _{Arctic} , APPDutch	Banwait <i>et al.</i> (2011); Herzog <i>et al.</i> (2004) [17, 56]
APP (Japanese)	Mutations within APP sequence (A4 E22G, A4 E22V)	Altered APP cleavage; reduced A β secretion; formation of oligomers (A4 E22G)	NO	NO	YES (-2.4mo)	YES	YES	Intra-cerebral accumulation of A β oligomers from brain; includes low hyperphosphorylation	TgAPP (E693)	Taniguchi <i>et al.</i> (2010) [57]
Multiple APP mutations	Combination of single APP FAD mutations	Combination of effects on APP processing/A β	YES	NO	NO	YES	YES	Increased amyloid pathology over single APP mutation models	TgCNSOL [20]	Chishti <i>et al.</i> (2001); Davis <i>et al.</i> (2004) [60, 61]
Amyloid-β (Aβ)	Human A β 40 or 42 fusion protein with B β	Overexpression and secretion of only A β , no extra APP cleavage product	YES; 3mo	NO	NO	YES	YES	Reactive gliosis and amyloid pathology only with A β 42 model; similar overexpression level as Tg2576	B β -A β 42	McGeer <i>et al.</i> (2005) [62]
Presenilin 1	FAD point mutations or exon 9 deletion in human PS1	Altered APP cleavage; enhanced A β 42:40 ratio	NO	NO	NO	YES	NO	Accelerated neurodegeneration in older mice -3.3mo; PS1 model also available with tau mutations, not commonly studied	PS1 (M146V), PS1 (60S)	Duff <i>et al.</i> (1996) [31]
Tau	Point mutations in human MAPT (FTD mutations)	Increased tau phosphorylation/aggregation	NO	YES (-6mo)	YES	YES	YES	Significant motor deficits, brain and spinal cord pathology in some strains. Indistinctly precise models may be more appropriate for cognitive behavioral studies	PIN1, MAPT (P301L), MAPT (V39)	Roseneau <i>et al.</i> (2005); Liu <i>et al.</i> (2003); Trovati <i>et al.</i> (2005) [53-55]
Multi-transgenic: APP/PS1	Double transgenic: APP FAD mutant overexpression, PS FAD mutant overexpression or knock in	Accelerated phenotype and pathology but minimal neurodegeneration	YES; 3-6mo	NO	NO	YES	YES	Significant hippocampal neuron loss in some models (APP; overline; PS1)	APP;over;PS1 (M146L), APP;over;PS1 (A246E)	Mickus <i>et al.</i> (2008); Morozov <i>et al.</i> (1997) [66, 67]
APP/Tau	Double transgenic: APP FAD mutant overexpression, tau FTD mutant overexpression	Accelerated phenotype and pathology but minimal neurodegeneration	YES; 6mo	YES	YES	YES	YES	Increased amyloid deposition compared to Tg2576/repets of high death rate	APP;over;MAPT (P301L), APP;over;MAPT (V39)	Lewis <i>et al.</i> (2001); Rabe <i>et al.</i> (2005) [68, 69]
APP/PS1/Tau	Triple transgenic: FAD APP and FTD tau transgenes in PS1 FAD knockin	Accelerated phenotype and pathology including MTs	YES; 3-6mo	YES	YES	YES	YES	Early intraneuronal deposits; plaques precede MAPT (P301L)	3-TgAPP (APP;over); PS1 (M146V); MAPT (P301L)	Galbraith <i>et al.</i> (2003) [70]

Taula III. Diferències entre models de l'AD i humans amb AD (Franco i Cedazo-Mínguez, 2014).

Models animals AD		Pacients	
Avantatges	Limitacions	Avantatges	Limitacions
Bons per a assaigs preclínic	Sobreexpressen versions mutants de proteïnes humanes i, per tant, no són models adequats per emular la forma més comú de l'AD en humans, la d'aparició tardana.	Mostren la patologia real	El diagnòstic final és <i>postmortem</i>
Viabilitat de l'obtenció dels transgènics amb deficients cognitius	La majoria no mostren pèrdua neuronal, per tant, aquests no són bons per a les proves de neuroprotecció en l'AD	Disponibilitat del líquid cefaloraquídi	Manca de biomarcadors per a la estratificació dels pacients (l'AD inclou segurament diferents patologies de base)
Els transgènics són bons models per a l'AD d'inici precoç (mutacions en els gens de les presenilines o APP)		Assaigs clínics pilot són factibles.	Manca de suficients biomarcadors per avaluar l'eficàcia de la intervenció en els assaigs clínics
Els transgènics són bons models per provar estratègies de millora cognitiva			Disponibilitat limitada dels pacients. És especialment difícil obtenir una població de pacients homogènia
Les intervencions poden començar abans que aparegui la patologia			Intervencions (en assaigs clínics) comencen després del diagnòstic; obviament, els tractaments no poden començar abans que apareguin els símptomes clínics
Els animals poden ser tractats i entrenats per aprendre (p.ex. en la prova del laberint aquàtic de Morris) simultàniament		Els assaigs clínics no inclouen l'entrenament simultani per aprendre mentre que en les intervencions en els models animals de l'AD sí.	Tasques d'entrenament i/o cognitives poden ser incloses al llarg de les intervencions terapèutiques
Moltes intervencions ofereixen resultats positius			Moltes intervencions en assaigs clínics ofereixen resultats poc conclouents/negatius

2.5.2 El model murí 3xTg-AD de l'AD

Els ratolí triple transgènic per a la malaltia d'Alzheimer alberga els transgens PS1_{M146V}, APP_{Swe} i tau_{P301L} (Oddo *et al.*, 2003a). Aquest model mimetitzava diversos símptomes de la malaltia en un patró temporal i neuroanatòmic similar a l'observat en els humans (Oddo *et al.*, 2003b, revisat per Giménez-Llort *et al.*, 2007). L'inici dels símptomes s'ha establert entre els 4 i 6 mesos d'edat, amb dèficits electrofisiològics (en LTP i fEPSP) a nivell hipocampal, problemes d'aprenentatge i memòria, deficiències colinèrgiques i alteracions emocionals, malgrat que, en aquest estadi inicial de la malaltia, els cervells només mostren immunoreactivitat β A intraneuronal (Oddo *et al.*, 2003a, 2003b; Kitawaza *et al.*, 2005). A partir dels 12 mesos d'edat el perfil neuropatològic és similar a les fases avançades de la malaltia en humans, amb la presència de dipòsits β A extracel·lulars i els cabdells neurofibril·lars de proteïna tau (Oddo *et al.*, 2003a, 2003b).

Des de la creació del ratolí 3xTg-AD per a la malaltia d'Alzheimer s'han realitzat una gran varietat de treballs d'investigació des de la vessant molecular fins a la conductual. D'una banda s'ha estudiat la validesa del model per mimetitzar les característiques de la malaltia observades en pacients i, de l'altra, s'han estudiat un gran nombre d'estratègies preventives i terapèutiques. En aquest model, factors com el gènere influeixen en la progressió de la malaltia (Giménez-Llort *et al.*, 2010) i a nivell conductual, els canvis no es restringeixen a l'esfera cognitiva. La recerca actual està demostrant que el model 3xTg-AD també emula BPSD (p.ex. España *et al.*, 2010; Giménez-Llort *et al.*, 2007; Baeta-Corral i Giménez-Llort, 2014) i alteracions de les activitats en la vida diària (Torres-Lista i Giménez-Llort, 2013). De fet, el nostre ha estat un dels laboratoris principals en l'estudi conductual d'aquest model utilitzant un ampli ventall de paradigmes conductuals estructurats en bateries que inclouen funcions sensoriomotors (barra de fusta, barra de metall, test del penja-robes), activitat exploratòria (camp obert, test de Boissier, taula dels forats, test d'alternança espontània i actimetries), emotivitat i ansietat (test de les cantonades, camp obert, caixa fosca/clara, laberint elevat en creu, test d'enterrament dels marbres), desesperança conductual (test de natació forçada) aprenentatge i memòria (laberint en T, laberint aquàtic de Morris, laberint radial de sis braços) i interacció social (barbering, test del tub, test d'agressivitat).

Aquesta caracterització fenotípica ha estat essencial en la valoració dels mecanismes i l'eficàcia d'estratègies preventives i terapèutiques, ja

siguin farmacològiques com per exemple, estudis fets amb nicotina (Oddo et al., 2005), memantina (Martínez-Coria et al., 2010), testosterona (Rosario et al., 2012), melatonina (García-Mesa et al., 2012) entre d'altres. També ho ha estat en l'estudi d'estratègies no farmacològiques, com l'estimulació sensorial (Arranz et al., 2011; Baeta-Corral i Giménez-Llort, 2014; Blázquez et al., 2014) o els hàbits i estils de vida, entre els quals destaquen l'exercici físic (Giménez-Llort et al., 2010; García-Mesa et al., 2011, 2014) i la dieta (Ma et al., 2009; Corona et al., 2011; Noristani et al., 2012; Barron et al., 2013).

L'estudi dels BPSD en aquest model animal 3xTg-AD per a la malaltia d'Alzheimer i la seva relació amb factors de risc, així com estratègies preventives i/o terapèutiques, constitueix l'eix vertebral dels diferents treballs que comprenen aquesta tesi doctoral.

2.6 Estratègies preventives i terapèutiques en recerca preclínica

2.6.1 Estratègies no-farmacològiques

i) Experiències en etapes inicials de la vida

Handling postnatal

En els mamífers, l'ontogènia es caracteritza per ser una etapa on s'esdevenen processos de desenvolupament dinàmics en la majoria dels òrgans i sistemes dels éssers vius. Els estímuls ambientals que acompanyin a l'organisme durant aquestes etapes primerenques de la vida poden influenciar aquests processos donant lloc a canvis fisiològics i comportamentals que poder persistir, fins i tot, en l'adultesa. Així doncs, ja durant les primeres setmanes de gestació, el desenvolupament cerebral està influenciat tant per factors genètics com ambientals, on ambdós tipus es troben en continua interacció (p.ex. Escorihuela et al., 1994).

Els efectes de l'ambient sobre el desenvolupament cerebral van ser primerament observats per Charles Darwin, qui l'any 1859 indicà que hi havia diferències morfològiques en els cervells de conill depenent de l'ambient on s'haguessin criat. També, a finals del segle XIX, Santiago Ramon i Cajal va demostrar la plasticitat del cervell durant el desenvolupament i la seva sensibilitat a factors ambientals gràcies als seus estudis que demostraven que els cervells més estimulants presentaven més sinapsis neuronals (veure Escorihuela et al., 1994).

Els efectes que tenia a llarg termini un tipus concret d'estimulació sensorial mitjançant la manipulació tàctil en etapes primerenques de la

vida no van ser descrits fins a la segona meitat del segle XX (Levine, 1957). Levine, juntament amb Chevalier i Korchin (Levine *et al.*, 1956), havia trobat que, en rates, la separació de les cries de la mare durant un període breu de temps produïa efectes beneficiosos en el perfil emocional d'aquests animals durant l'adulthood. Posteriorment, aquest procediment va prendre el nom de handling postnatal (PH). A partir de llavors s'utilitzà aquest terme de manera sistemàtica per designar la breu separació maternal dels recents nascuts des del dia 1 al 21 postnatal (3-20 minuts, depenent dels autors), un mètode senzill per induir canvis tant conductuals com fisiològics. Els temps de separació maternal és crític, ja que una separació diària més perllongada (1 hora o més) genera una font d'estrès, tal i com indica l'augment dels nivells d'ACTH i corticosterona de les cries, fet que pot portar conseqüències conductuals negatives a llarg termini (Pryce i Feldon, 2003; Millstein i Holmes, 2007; Parffit *et al.*, 2007). En canvi, se sap que períodes breus de separació maternal (per exemple, 10-15 minuts) tenen efectes beneficiosos tant a nivell fisiològic com conductual, com així ho demostren un nombrós grup de treballs reportats en la literatura (Fernández-Teruel *et al.*, 2002; Levine, 1962; Núñez *et al.*, 1995; Steimer *et al.*, 1998; Meerlo *et al.*, 1999).

Els efectes positius d'aquest procediment sobre la conducta, sobretot en el perfil ansiós i emocional, han estat àmpliament descrits en molts estudis comportamentals. Comparats amb els animals control, els animals tractats són menys ansiosos tant en els tests clàssics no condicionants (Núñez, *et al.*, 1995; Steimer *et al.*, 1998; Meerlo *et al.*, 1999) com els condicionants (Gschanes *et al.*, 1995; Núñez *et al.*, 1996; Meerlo *et al.*, 1999). A més, aquests efectes no només es troben en l'"estat" ansiós sinó també en el "tret" ansiós (Chapillon *et al.*, 1999). No obstant, a vegades els efectes del handling postnatal poden quedar diluïts o fins i tot absents. El motiu principal pel qual s'explica aquest fet és la influència que tenen els factors genètics, tal i com es demostra en diversos estudis on es van utilitzar diferents soques de rata (Fernández-Teruel, *et al.*, 1997; Durand *et al.*, 1998). Alhora, controlar les condicions experimentals també és fonamental per evitar resultats erronis (Roy i Chapillon, 2002).

Resulta interessant esmentar el paper protector que té el PH davant del declivi associat a l'edat de certes habilitats d'aprenentatge i memòria. En aquest sentit, el PH facilita la potenciació a llarg termini (LTP, en anglès) així com la capacitat de prevenir la degeneració neuronal associada a l'edat (p.ex, Meaney *et al.*, 1988; Fernández-Teruel *et al.*, 1997; Aguilar *et al.*, 2002).

Pel que fa als efectes fisiològics, Levine també va ser pioner en l'estudi dels efectes neurobiològics del handling postnatal i els canvis provocats sobre l'eix HPA (Levine, 1967). Els treballs realitzats demostraven que, davant diferents estressors, els animals tractats presentaven un millor sistema de regulació neuroendocrí que els animals control. Anys després, gràcies al desenvolupament de noves tècniques d'assaig s'han pogut detectar diferències més precises entre els animals tractats i control, com per exemple, nivells més baixos d'hormona alliberadora de corticotropina (CRH) en l'eminència mitja de les rates tractades (Plotsky i Meaney, 1993) o una major densitat de receptors glucocorticoides en l'hipocamp i el còrtex frontal, sent aquests importants en la regulació de l'eix HPA (Meaney *et al.*, 1985) i possiblement els responsables d'una retroalimentació negativa més eficient, la qual regula la secreció de corticosterona (Levine, 2000).

El handling postnatal i l'enriquiment ambiental comparteixen mecanismes i tenen efectes sinèrgics en rosegadors (Fernández-Teruel *et al.*, 2002). Malgrat això, el nombre d'estudis amb PH és baix en comparació a l'enriquiment ambiental o l'exercici. La justificació d'aquest fet radica en la dificultat metodològica que comporta l'administració del handling, dut a terme durant l'etapa ontogènica neonatal, en ventrades amb un nombre similar de cries i sota una programació horària.

En resum, tot i que hi ha resultats contradictoris que probablement es puguin explicar pel tipus de soca o base genètica utilitzada, o bé per lleus modificacions en l'aplicació del procediment, el handling postnatal produeix efectes positius a llarg termini, com són la millora de la resposta endocrina a l'estrès així com de l'aprenentatge i memòria.

ii) Hàbits i estils de vida

Enriquiment ambiental

El concepte d'enriquiment ambiental (en anglès, *environmental enrichment* EE), en rosegadors, es refereix a una millora significativa de les condicions d'estabulació. En general, les gàbies solen ser d'una mida més gran que les habituals i contenen objectes i espais diversos, que faciliten l'increment de l'estimulació sensorial, cognitiva i motora respecte les condicions estàndard d'estabulació. Però l'estimulació ambiental no només comprèn estratègies d'enriquiment físic, sinó també d'enriquiment social, com pot ser el que s'aconsegueix mitjançant l'augment del nombre d'animals per gàbia

(Nithianantharajah i Hannan, 2006), on s'estableixen interaccions dinàmiques i variables entre els diferents subjectes que cohabituen en el mateix espai (Stewart i Bayne, 2004).

Actualment, no hi ha un paradigma únic de l'EE ideal pel que fa als efectes beneficiosos sobre el cervell i la conducta. Dins del gran ventall de combinacions metodològiques, sembla ser que aquelles que aporten una gran complexitat i novetat ambiental són les més favorables per a proporcionar majors nivells d'estimulació sensorial, cognitiva i motora. Tot i així, cal tenir en compte diversos factors que hi influeixen, com per exemple, el tipus de soca, l'edat d'inici o el temps d'exposició a l'EE.

En general, els efectes principals deguts a l'EE són molt amplis. A nivell molecular, els canvis s'observen en la modificació d'un gran nombre de gens relacionats amb l'estructura neuronal, la transmissió sinàptica i la plasticitat. Els canvis morfològics cel·lulars o cerebrals, són igualment rellevants, tals com la densificació dendrítica o l'increment de la neurogènesi que es dona en certes àrees corticals i l'hipocamp. A nivell conductual, l'EE indueix un increment de l'activitat exploratòria i de l'aprenentatge i la memòria. També redueix l'ansietat i la temerositat. Aquest ampli ventall d'accions neurobiològiques i psicològiques dona a aquesta estratègia un punt d'interès per a ser utilitzada en models animals de malalties neurodegeneratives i, concretament, en el cas de l'AD, un gran nombre d'estudis corroboren dits efectes beneficiosos. Pel que fa al model 3xTg-AD, el tractament d'EE pot tenir efectes beneficiosos actuant sobre la xarxa de sistemes reguladors neuroimmunoendocrins (Arranz *et al.*, 2011) i sobre l'ansietat i la conducta exploratòria (Blázquez *et al.*, 2014). D'altra banda, l'exercici físic voluntari, un dels components presents en molts dissenys experimentals de l'EE, promou efectes beneficiosos sobre la funció sinàptica i cerebral (García-Mesa *et al.*, 2011).

2.6.2 Estratègies farmacològiques

En paral·lel a l'escenari d'estratègies farmacològiques a nivell clínic, els estudis experimentals busquen no només el desenvolupament d'estratègies enfocades a modificar el procés de la malaltia, sinó també aquelles que permetin prevenir o endarrerir l'inici de la malaltia (revistat per Anand *et al.*, 2014).

Cafeïna

Tal com s'ha detallat en l'apartat dels aspectes clínics de la malaltia d'Alzheimer, la cafeïna està emergint com un agent protector. A nivell experimental, estudis recents en ratolins indiquen que tant la cafeïna com altres antagonistes dels receptors d'adenosina prevenen l'acumulació β A dins i pels voltants dels vasos sanguinis cerebrals, la qual és en part responsable dels dèficits cognitius (Gahr *et al.*, 2013; Cupino i Zabel, 2014). De manera similar, el consum crònic de cafeïna reverteix els danys cognitius i els nivells de β A cerebrals en ratolins transgènics per a l'AD (Arendash *et al.*, 2009; Cao *et al.*, 2009; Chu *et al.*, 2012). Un altre dels mecanismes d'acció de la cafeïna és a través de l'estimulació de cascades pro-supervivència i la inhibició de vies pro-apoptòtiques en l'estriat i/o en el còrtex, de manera que la cafeïna promou la supervivència neuronal i redueix el procés de neurodegeneració (Arendash *et al.*, 2009; Zeitlin *et al.*, 2011).

Ara bé, tot i els avantatges que tant estudis clínics com preclínics han demostrat, cal tenir present que la cafeïna podria causar efectes adversos en els pacients que presentin un perfil BPSD de tipus emocional, ja que els seus efectes estimulants podrien exacerbar-ne els símptomes (Johansson *et al.*, 2001), fet que podria contrarestar o emmascarar els beneficis reportats en la funció cognitiva. Per tant, tot i semblar que la cafeïna pugui ser un tractament prometedor i sigui fàcil d'aplicar, calen més estudis que valorin l'impacte d'aquest tractament en els pacients que se'ls hagi diagnosticat algun tipus de BPSD de tipus ansiós o trastorns circadians. A nivell experimental, tot i que un nombre important d'estudis mostren els efectes beneficiosos de la cafeïna sobre la cognició, encara no hi ha cap que plantegi quins són els efectes del tractament crònic amb cafeïna sobre el perfil ansiós que alguns models presenten associat a la malaltia d'Alzheimer.

D-galactosa

L'envelliment normal s'associa amb la pèrdua gradual de capacitats cognitives i motores. En canvi, a nivell patològic, en els trastorns neurològics associats a l'edat, el deteriorament cognitiu és ràpid, donant lloc a alteracions que afecten a la vida diària. A més a més, la patologia de diferents malalties sovint implica processos comuns, com per exemple l'alteració en la funció mitocondrial. En aquest sentit, molts estudis indiquen que la disfunció mitocondrial i l'estrès oxidatiu són uns dels principals responsables del procés d'envelliment ja que hi participen activament, alhora que també són uns dels causants d'algunes malalties neurodegeneratives. La disfunció mitocondrial es

caracteritza per una reducció de la fosforilació oxidativa i un increment dels radicals lliures i de les espècies reactives de l'oxigen (en anglès, *reactive oxygen species* ROS) (veure figura III). Estudis recents van trobar un augment d'aquestes ROS associat amb l'edat però també en certes malalties com en l'Alzheimer, el Parkinson i el Huntington (Carvalho *et al.*, 2009; Quintanilla i Johnson, 2009; Winklhofer i Haass, 2010). La formació en excés de ROS pot danyar lípids, proteïnes o el DNA cel·lular, i per tant, alterar la funció normal i la homeostasi dins la cèl·lula i finalment, causar la mort cel·lular (Paradies *et al.*, 2001). Així doncs, és possible que una estratègia terapèutica efectiva pel tractament de les malalties associades a l'edat sigui aquella que s'adreci a la prevenció de l'apoptosi neuronal induïda per l'estrès oxidatiu.

S'ha demostrat que l'administració crònica de D-galactosa (D-gal) pot causar una acumulació de ROS, estimular indirectament la producció de radicals lliures i finalment, donar a lloc a nivells alts d'estrès oxidatiu que originin canvis neuroquímics i conductuals (Lu *et al.*, 2007).

Breument, la galactosa és un carbohidrat reductor que reacciona fàcilment amb les amines lliures dels aminoàcids de proteïnes i pèptids donant lloc a productes finals de glicació avançada (en anglès, AGE), fenomen observat tant *in vitro* com *in vivo* (Bucala i Cerami, 1992; Vlassara *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 2006). Durant l'envelliment natural hi ha un increment de la concentració d'AGE, però això també s'ha observat en malalties associades a l'edat, com per exemple la diabetis, aterosclerosi i també la malaltia d'Alzheimer (Vlassara *et al.*, 1994; Li i Dicks, 1997).

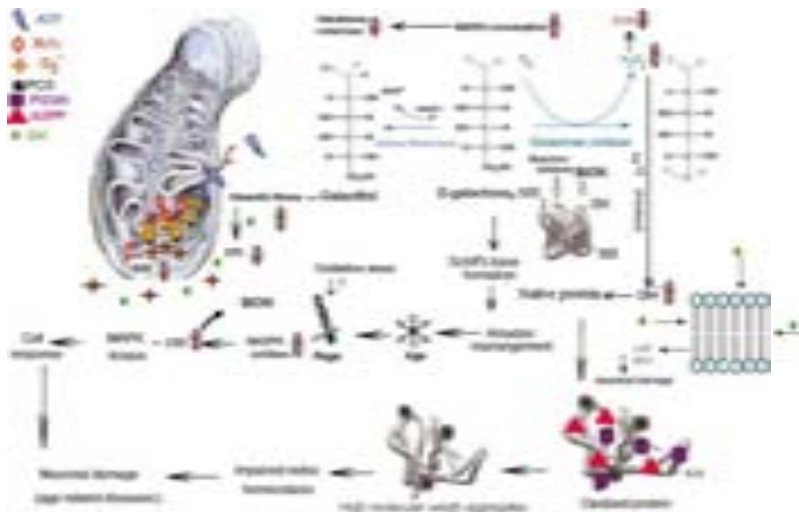


Figura III. Esquema dels mecanismes d'acció de la D-galactosa en el mimetisme de l'envelliment (Yanar *et al.*, 2011).

Coneguts els efectes de la D-galactosa, un gran nombre de laboratoris han utilitzat l'administració crònica amb D-gal en rosegadors amb la finalitat d'accelerar el procés d'envelliment i obtenir un bon model que mimetitzi els danys cel·lulars i funcionals associats a l'edat. Principalment, la D-galactosa causa un augment de la producció de radicals lliures en cervell (Song *et al.*, 1999), sobretot en àrees amb gran sensibilitat a l'estrès oxidatiu, com el còrtex cerebral, l'hipocamp i l'estriat (Beckman i Ames, 1998). I, com a conseqüència, ocasiona una disminució progressiva de la capacitat d'aprenentatge i la memòria i de les habilitats motores (Lei *et al.*, 2008).

Per tant, si la generació excessiva de ROS en els casos de disfunció mitocondrial és la principal causa de danys intracel·lulars, és lògic pensar que l'ús d'antioxidants esdevingui una teràpia útil per al dany mitocondrial induït per ROS. De fet, durant els últims anys s'estan fent grans esforços per aconseguir suplementos dietètics i aliments rics en antioxidants naturals que puguin contrarestar els efectes adversos associats a l'edat, com l'ús del resveratrol (Zhao *et al.*, 2012), la melatonina (Yoo *et al.*, 2012) i els flavonoides (Kumar *et al.*, 2010), entre d'altres. Ara bé, els resultats són controvertits, ja que no tots els estudis repliquen els dèficits cognitius i/o motors induïts per la D-

galactosa. Concretament, alguns autors suggereixen que els efectes del tractament crònic amb D-gal només afecten a algunes funcions, més que causar un envelliment general prematur (He *et al.*, 2009; Chang *et al.*, 2014) mentre que d'altres indiquen que el tractament no ocasiona cap tipus d'afectació (Parameshwaran *et al.*, 2010). En conjunt, el que està clar és que una millor comprensió de la naturalesa de la disfunció mitocondrial durant l'envelliment normal i en fases primerenques de malalties neurodegeneratives podrien donar llum sobre la patogènesi del declivi cognitiu, facilitant el camí per al desenvolupament de millors estratègies terapèutiques.

En la següent taula es detallen alguns dels estudis realitzats amb D-galactosa utilitzada com a model d'envelliment accelerat. Tot i que el tractament crònic amb D-galactosa és un bon mecanisme per aconseguir un model de dany oxidatiu i disfunció cognitiva associats a l'edat, la taula reflecteix la gran variabilitat que existeix entre els estudis publicats pel que fa al mètode utilitzat, on s'inclou la dosi i la duració del tractament, així com el gènere, l'edat i la soca dels animals utilitzats donant lloc a múltiples dissenys experimentals. Un estudi recent va analitzar alhora els efectes del tractament crònic de D-gal en ratolins de diferents edats i en ambdós gèneres i va demostrar que el dèficit cognitiu associat al tractament de D-galactosa depenia de la durada del tractament, juntament amb els factors gènere i edat (Hao *et al.*, 2014).

autor	model/soca animal	edat	dosi	via adm	duració	tests conductuals	efectes
Song <i>et al.</i> , 1999	Ratolins ♀ c57bl/6J	5M	50mg/kg	s.c	56D	Test activitat motora espontània Test del pas a través	Disminució de l'activitat locomotora i de la memòria
Xu i Zhao, 2002	Ratolins ♂ i ♀ Kunming (grups mixtos)	?	120mg/kg	s.c	42D	OF Y-maze	Disminució de l'activitat locomotora i de la memòria
Wei <i>et al.</i> , 2005	Ratolins ♀ c57bl/6J	3M	50mg/kg 100mg/kg 200mg/kg	s.c	56D	MWM ORT Actímetria	Efectes negatius sobre l'activitat locomotora i la cognició dependent de la dosi 50≠100=200

Lu <i>et al.</i> , 2006	Ratolins ♂ Kunming	1.5 M	50mg/kg	<i>s.c</i>	56D	OF Test del pas a través MWM	Disminució de l'activitat locomotora i de la memòria
Lu <i>et al.</i> , 2007	Ratolins ♂ Kunming	2.5 M	50mg/kg	<i>s.c</i>	56D	OF MWM	Disminució de l'activitat locomotora i de la memòria
Chen <i>et al.</i> , 2006	Rates ♂ i ♀ Sprague- dawley	12M	100mg/kg	<i>s.c</i>	56D	MWM	Efectes negatius sobre funcions cognitives
Luo <i>et al.</i> , 2009	Ratolins Kunming	?	90mg/kg	<i>s.c</i>	90D	MWM	Efectes negatius sobre funcions cognitives
Shan <i>et al.</i> , 2009	Ratolins ♂ Kunming	?	500mg/kg	<i>s.c</i>	56D	OF PAT	Disminució de l'activitat locomotora i de la memòria
Kumar <i>et al.</i> , 2009	Ratolins ♂ Swiss albino	2- 3M	100mg/kg	<i>s.c</i>	42D	EPM OF MWM	Efectes negatius sobre funcions sensoriomotores i cognitives
Kumar <i>et al.</i> , 2010	Ratolins ♂ LACA	2- 3M	100mg/kg	<i>s.c</i>	42D	EPM OF MWM	Efectes negatius sobre funcions sensoriomotores i cognitives
He <i>et al.</i> , 2009	Ratolins ♂ i ♀ Kunming	1.5- 2M	150mg/kg	<i>s.c</i>	42D	Test activitat motora espontània MWM	Cap efecte sobre l'activitat motora. Efectes negatius sobre les funcions cognitives
Parameshwaran <i>et al.</i> , 2010	Ratolins ♀ c57bl/6J	2M	100mg/kg	<i>i.p.</i>	42D	Rotarod OF Y-maze	Cap efecte sobre funcions sensoriomotores o cognitives
Yoo <i>et al.</i> , 2011	Ratolins ♂ c57bl/6J	1.5 M	100mg/kg	<i>s.c</i>	70D	MWM	Efectes negatius sobre funcions cognitives
Yanar <i>et al.</i> , 2011	Rates ♂ Sprague- dawley	5M	60mg/kg	<i>i.p.</i>	42D	MWM	Efectes negatius sobre funcions cognitives
Tian <i>et al.</i> , 2011	Ratolins Kunming	?	150mg/kg	<i>i.p.</i>		OF MWM	Disminució de l'activitat locomotora i de la memòria

Priscila Dulcy <i>et al.</i> , 2012	Rates Wistar	3M	100mg/kg	<i>s.c</i>	56D	Aprentatge a la por contextual	Efectes negatius sobre funcions cognitives
Zhou <i>et al.</i> , 2012	Ratolins ♂ ICR	?	100mg/kg	<i>s.c</i>	42D	MWM	Efectes negatius sobre funcions cognitives
Lan <i>et al.</i> , 2012	Ratolins ♂ ICR	?	100mg/kg	<i>s.c</i>	42D	Test evitació passiva tipus pas a través MWM	Efectes negatius sobre funcions cognitives
Gu <i>et al.</i> , 2013	Rates ♂ Sprague-dawley	2M	100mg/kg	<i>s.c</i>	56D	OF	Disminució de l'activitat locomotora
Tikhonova <i>et al.</i> , 2014	Rates ♂ Wistar	3M	150mg/kg	<i>i.p.</i>	57D	OF T-maze ORT	Efectes negatius sobre funcions cognitives però cap efecte sobre l'activitat locomotora.
Chang <i>et al.</i> , 2014	Ratolins ♂ c57bl/6J	2M	125mg/kg	<i>s.c</i>	56D	MWM Rotarod Grip strenght test	Disminució de la capacitat de suspensió però no hi ha efectes negatius en la coordinació motora ni en l'aprenentatge
Hao <i>et al.</i> , 2014	Ratolins ♂ i ♀ c57BL/6	2M/ 6M	100mg/kg	<i>s.c</i>	42/70D	Y-maze	Disminució de les capacitats cognitives depenent de la durada del tractament, del gènere i de l'edat

Taula IV. Taula representativa de la varietat d'estudis realitzats amb D-galactosa en rosegadors.

2.7 Nocicepció en la recerca preclínica

L'homologia dels processos biològics bàsics com la 'nocicepció' que existeix entre els animals, ha fet que alguns d'ells, la majoria rosegadors, esdevinguin una eina rellevant en la investigació bàsica i preclínica del dolor (Handwerker i Arendt-Nielsen, 2013). A més, el modelatge en animals de les malalties psiquiàtriques i neurològiques ha aportat noves possibilitats per a l'estudi a nivell experimental de la comorbiditat del dolor. No obstant, malgrat una gran part dels estudis d'investigació realitzats ha estudiat l'impacte de les disfuncions cognitives relacionades amb el dolor i els trastorns afectius (Liu i Chen, 2014), tan sols un nombre limitat de treballs experimentals ha examinat el dolor en models animals de deteriorament cognitiu o demència i encara són menys els que han tingut en compte factors crítics com l'envelliment o el gènere (revisat per Mogil, 2009). Les qualitats, però també les limitacions inherents dels animals en l'expressió del dolor tal i com es concep en els éssers humans, proporcionen informació útil per a l'avaluació del dolor en pacients amb deteriorament cognitiu o demència que presenten capacitats comunicatives reduïdes o absents. Per tant, el treball dels investigadors bàsics s'utilitza per fer front a les dificultats que els psiquiatres i neuròlegs troben quan s'enfronten al dolor dels seus pacients (Lukas *et al.*, 2012). Així, en absència de l'equivalència dels autoinformes, les proves de nocicepció han de basar-se en puntuacions objectives, que van des d'un simple reflex de retirada nocifensiva a conductes operants complexes.

En aquesta tesi doctoral presentem, a mode d'annex, les primeres dades preliminars en ratolins 3xTg-AD que demostren ja que a fases prodròmiques i en l'inici dels estadis moderats de l'AD, la sensibilitat dels ratolins 3xTg-AD a un estímul tèrmic fred està inalterada respecte a animals NTg de la mateixa edat. A la prova de retirada de la cua, la latència de la resposta d'evitació es va incrementar de manera dependent de l'edat, però de forma equivalent respecte la seva soca control c57bl/6 (pòster Baeta-Corral *et al.*, 2014). En el llinar de dolor dels animals 3xTg-AD vells en la prova de la placa calenta també altres investigadors han trobat l'equivalència amb els controls (Filali *et al.*, 2012).

Objectius

3. Objectius

Aquesta tesi doctoral té per objectiu general estudiar a nivell conductual, en ratolins 3xTg-AD i NTg, l'impacte de diversos factors de risc biològic (genètic i no genètic) i ambientals per a la malaltia d'Alzheimer, més enllà dels dèficits cognitius característics, posant així especial atenció en els Síntomes Comportamentals i Psicològics associats a aquesta Demència (BPSD), que estan poc estudiats.

En particular, per a cada un dels tres estudis que componen aquesta tesi, els objectius són:

Estudi I. Caracteritzar les conductes bizarres i la conducta de valoració del risc en ratolins mascles i femelles 3xTg-AD als 6 mesos d'edat, que es correspon amb les etapes primerenques de la malaltia. En aquest context, avaluar també el potencial beneficiós del handling postnatal (PH), una estimulació tàctil sensorial administrada durant l'ontogènia, coneguda per exercir efectes positius a llarg termini sobre els perfils conductuals relacionats amb l'estrès i les conductes ansioses.

Estudi II. Fase 1. Caracteritzar les estratègies de navegació en el laberint aquàtic de Morris en ratolins mascles 3xTg-AD als 13 mesos d'edat, que es correspon amb les etapes avançades de la malaltia, quan presenten un fort perfil BPSD, amb l'objectiu de trobar característiques distintives basades en criteris en funció de la finalitat (presència/absència d'estratègies de recerca), la direccionalitat (presència/absència d'estratègies dirigides a un objectiu) i la varietat (ús d'una o més estratègies) que permetin distingir aquest genotip del NTg en diferents paradigmes d'aprenentatge i memòria.

Estudi II. Fase 2. Avaluar els efectes conductuals del tractament crònic oral amb una dosi baixa de 0,3mg/Kg de cafeïna en ratolins mascles 3xTg-AD i NTg als 13 mesos d'edat mitjançant una àmplia bateria de tests conductuals per tal de verificar els efectes cognitius que se li atribueixen en vers a la malaltia i estudiar el seu possible impacte quan existeix un perfil BPSD exacerbat.

Estudi III. Avaluar, en ratolins mascles i femelles NTg als 6 mesos d'edat, els efectes dosi resposta conductuals a nivell motor, cognitiu i emocional/ansiós de l'administració crònica s.c. de 0-50-100mg/Kg de D-galactosa, un model farmacològic d'envelliment accelerat.

Materials i Mètodes

4. Materials i Mètodes

En aquesta tesi doctoral es realitza una aproximació experimental de tipus translacional que utilitza com a subjectes d'estudi els ratolins triple-transgènics 3xTg-AD, model murí per a la malaltia d'Alzheimer, i els seus congèneres salvatges, els híbrids c57bl/6 x 129 o la soca pura c57bl/6. Ho fa tot seguint la legislació 2010/69/EU en relació amb la cura i ús d'animals per a mètodes experimentals. A més, l'estudi compleix les pautes ARRIVE desenvolupades per les NC3Rs (Kilkenny *et al.*, 2010) que busquen també limitar, en el possible, el nombre d'animals experimentals.

4.1 Animals

Els ratolins transgènics 3xTg-AD que alberguen els transgens PS1/_{M146V}, APP_{Swe} i tau_{P301L} van ser genèticament enginyats a la Universitat de Califòrnia Irvine, prèviament ja descrit (Oddo *et al.*, 2003a). Breument, dos transgens independents (que codifiquen els gens humans APP_{Swe} i tau_{P301L}, ambdós sota control de l'element regulador Thy1.2 de ratolí) van ser co-injectats en cèl·lules embrionals obtingudes a partir de ratolins mutants homozigots PS1_{M146V} knock-in (PS1KI). Els ratolins PS1 knock-in van ser creats originalment com a híbrids c57bl/6 x 129.

4.2 Programació de la cria i manteniment

El propi personal investigador va ser l'encarregat d'establir un programa de cria i manteniment de les dues colònies d'animals en el nostre laboratori de la *Unitat de Psicologia Mèdica, Universitat Autònoma de Barcelona*. D'aquestes colònies és d'on es van obtenir els animals dels estudis I, II i IV pertanyents a aquesta tesi. L'estudi III va utilitzar animals de la nova colònia pura c57bl/6 establerta a Harlan Iberica S.L. (Sant Feliu de Codines, Barcelona) que van ser traslladats al nostre laboratori als dos mesos d'edat.

Tots els animals van ser allotjats i mantinguts en gàbies d'establiment estàndard (Makrolon, 35x35x25cm) sota condicions de laboratori estàndard (12h llum:fosc, inici de cicle a les 8:00h, disponibilitat de menjar i aigua *ad libitum*, 22±2°C, 50-60% humitat). Tots els experiments van ser duts a terme entre les 9:00h i les 13:00h excepte l'activitat circadiana que va ser enregistrada durant tot el període de llum/fosc (DL).

4.3 Tractaments

Estudi I. Handling postnatal

El mètode del handling postnatal (en anglès *postnatal handling*, PH) va consistir en separar les cries de la mare i col·locar-les individualment en compartiments de plàstic coberts amb paper absorbent. Durant la sessió, els animals van ser manipulats suaument i reberen 4 estimulacions tàctils al llom. Aquest procediment va ser repetit 3 vegades cada 8 minuts, dues vegades al dia des del dia 1 fins als dia 21 postnatal. Les cries dels grups control no es van manipular excepte per a la neteja de les gàbies, un cop per setmana.

Estudi II. Fase 2. Tractament crònic de cafeïna

Es va permetre als ratolins beure *ad libitum* aigua de beguda o aigua de beguda cafeïnada amb una dosi de 0,3mg/Kg (Sigma, St. Louis, MO, USA) començant als 6 mesos d'edat. El disseny experimental final va consistir en els següents grups experimentals: NTg vehicle, NTg cafeïna, 3xTg-AD vehicle and 3xTg-AD cafeïna ($n=8-10$, en cada grup experimental). El tractament amb cafeïna continuà durant l'etapa d'avaluació conductual fins la finalització de l'experiment (13 mesos d'edat).

Estudis previs han confirmat que aquesta pauta del tractament aporta una dosi diària d'1,5mg de cafeïna en els ratolins i és equivalent a un consum aproximat de 500mg diaris de cafeïna (aproximadament 5 tasses de cafè) en els humans (Arendash *et al.*, 2006). Una concentració plasmàtica d'aproximadament 30 μ M (al voltant de 3 tasses de cafè diàries) és la que s'ha recomanat per a avaluar els efectes beneficiosos de la cafeïna a nivell cognitiu (Costenla, *et al.*, 2010).

Estudi III. Tractament crònic de D-galactosa

A l'edat del 4 mesos, els ratolins van ser injectats subcutàniament (*s.c*) durant 56 dies amb una solució salina o amb una dosi de D-galactosa (Sigma, St. Louis, MO, USA) de 50mg/Kg o 100mg/Kg, en un volum en mL del 10% del seu pes corporal. El disseny experimental final va consistir en els següents grups experimentals per a cada gènere: NTg vehicle, NTg 50mg/Kg i NTg 100mg/Kg ($n=9-10$, en cada grup experimental). Amb la finalització del període del tractament amb galactosa, s'inicià l'etapa d'avaluació conductual (6 mesos d'edat).

4.4 Estudis conductuals

Els diferents estudis que componen la present tesi doctoral es van realitzar a través d'una sèrie de proves o bateria conductual estandarditzada, utilitzada prèviament en el nostre laboratori (Giménez-Llort *et al.*, 2002). A continuació es detallen els tests utilitzats per a l'avaluació de les condicions físiques i les habilitats motores, les capacitats d'aprenentatge i memòria, així com patrons de respostes conductuals que inclouen l'activitat exploratòria, la neofòbia i conductes associades a l'ansietat.

Test de les cantonades o Corner test (CT)

El test de les cantonades (CT, *corner test*) s'utilitza per avaluar la neofòbia o por a la novetat i consisteix en introduir a l'animal en el centre d'una gàbia de plàstic estàndard (idèntica a la que s'utilitza per a la seva estabulació) amb 5cm de gruix d'encenall net i inodor. En aquest test s'avalua la conducta espontània de l'animal durant un període de 30 segons i es registren el nombre cantonades visitades (l'animal ha d'explorar la cantonada), la latència de realitzar el primer *rearing* o aixecament vertical (l'animal ha de sostenir-se de peu sobre les potes del darrera, recolzant-se a la paret o no) i el nombre de *rearings* realitzats. Per a cada animal s'utilitza una gàbia nova (neta) per tal d'evitar possibles interferències en aquesta conducta a causa del rastre d'olor d'altres animals.

Test del camp obert o Open field test (OF)

El test del camp obert (OF, *open field test*) s'utilitza per avaluar la reactivitat emocional i l'activitat exploratòria dels rosegadors en un ambient ansiogènic. En aquest test, l'animal es col·loca en el centre d'una capsa de fusta (55x55x25cm) blanca i il·luminada i s'avalua la conducta de l'animal durant un període de 5 minuts. Es mesura la latència o duració dels següents esdeveniments conductuals: *frezzing behavior* o conducta de congelació, temps de sortida del centre i d'arribada a la perifèria i la conducta de *grooming* o d'empolainament. La presència i el nombre total de conductes bizarres també són mesurades seguint dos característiques distintives: 1) estereotipades o no i 2) amb activitat horitzontal o vertical. Segons aquest criteri, el llistat de conductes bizarres resutà en: estiraments estereotipats: estiraments repetitius del cap i/o del cos que implica una rotació horitzontal espacial de 360°; aixecaments estereotipats: aixecaments verticals repetitius sense suport de la paret; caminar cap enrere: locomoció cap enrere i salts: salts verticals. També es va mesurar

l'activitat locomotora horitzontal (el nombre *crossings* o creuaments de 10x10cm) i la vertical (latència i nombre total de *rearings*). Finalment, s'anoten el nombre de defecacions i la presència o absència d'orina.

Test de la caixa llum/foscor o Dark/light box test (DLB)

La caixa fosca/clara (Panlab, S.L., Barcelona, Spain) consisteix en dos compartiments (negre i fosc, 27x18x27cm o bé blanc i il·luminat 20W, 27x27x27cm) connectats per una obertura (7x7cm). Els animals es col·loquen en el compartiment fosc i són observats durant 5 minuts. La latència a entrar en el compartiment clar, el nombre d'entrades, el temps total en aquest compartiment i l'activitat exploratòria (nombre de *crossings* i *rearings*) dels animals són els paràmetres enregistrats. La conducta d'avaluació del risc es mesura mitjançant la latència i el nombre d'estiraments d'aproximació (SA, *stretch attendance*) cap a l'àrea clara. Finalment, s'anoten el nombre de defecacions i la presència o absència d'orina en cada compartiment.

Test de la taula de forats o Hole-board test (HB)

En aquest test, els ratolins es col·loquen en una cantonada de l'aparell (compartiment de fusta blanc de 32x32x32cm) amb quatre forats equidistants (3cm de diàmetre) en la base de l'aparell. L'activitat exploratòria dirigida a un objectiu (nombre de forats explorats, introduint el cap fins a les orelles) i la no dirigida a un objectiu (nombre de *rearings*) es mesura durant 5 minuts. A més, també s'anota el temps consumit explorant els forats i les latències de realització del primer moviment i del primer forat explorat. S'estableix com a criteri d'haver assolit l'objectiu de la prova el fet d'haver explorat els 4 forats. També es mesuren el nombre d'errors, mot que designa el fet de repetir forats ja explorats abans d'aconseguir arribar al criteri establert. Finalment, s'anoten el nombre de defecacions i la presència o absència d'orina.

Test del laberint elevat en creu o Elevated-plus maze test (EPM)

Aquest test (laberint de fusta lacat en negre) està format per dos braços tancats (*enclosed arms*, EA; 30,3x5,3x15cm, parets opaques) i dos oberts (*open arms*, OA; 30,3x5,3x15cm, parets transparents de Plexiglass), col·locats en forma de creu creant un espai quadrat central de 5,3x5,3cm. L'aparell es troba a 40cm del terra. L'animal és col·locat en el centre del laberint en creu, encarat cap a un dels braços oberts. Durant 5 minuts, es mesuren la latència d'entrada a un dels OA, el nombre d'entrades i el temps consumit tant en els OA com els EA. L'índex d'ansietat TOA/(TOA+TEA) és el que es calcula a partir del

temps en els OA/(temps en els OA+ temps en els EA). Finalment, s'anoten el nombre de defecacions i la presència o absència d'orina.

Test del laberint en T o T-maze test (TM)

El laberint en T està format per dos braços de 25x8cm i un braç llarg de 30x8cm disposats en forma de T. Hi ha dos tipus de paradigmes que s'avaluen en aquest test: la prova d'alternança espontània i la prova de memòria de treball.

En la prova d'alternança espontània, els animals són col·locats en l'extrem del braç llarg de la T i durant 5 minuts que dura la prova l'animal realitza una exploració que és lliure. Es mesura la latència a arribar a la zona de creuament dels braços i el temps que l'animal requereix per completar l'exploració d'ambdós braços.

La prova de memòria de treball, es duu a terme en dues fases: la primera, anomenada assaig d'elecció forçada (*forced trial*) i la segona, la de memòria o evocació (*recall trial*) amb un interval de 90 segons entre ambdues. En la prova d'elecció forçada, només un dels braços és accessible, seguint un ordre a l'atzar i de manera contrabalancedada entre els grups experimentals. L'animal es col·loca mirant a l'extrem que forma la base de la T i i es deixa que explori lliurement el laberint en forma de L, durant un màxim de 5 minuts. L'animal es retira un cop ha explorat el braç durant 20 segons, interval de temps establert com a criteri d'aprenentatge. En la prova de memòria, l'animal torna a tenir l'opció d'explorar el laberint lliurement, només que ara, en aquest cas, tots dos braços són accessibles. S'anoten els braços triats per l'animal, la latència d'entrada i el temps que hi transcorre en cada un d'ells. A partir d'aquí es calculen el nombre d'errors previs a l'elecció del braç no accessible en l'anterior prova. Finalment, s'anoten el nombre de defecacions i la presència o absència d'orina en cada una de les proves.

Test d'enterrament de marbres o Marble test (MBT)

El procediment de la prova d'enterrament de marbres va ser dut a terme amb petites modificacions de la descrita per Broekkamp *et al.*, 1986. Els ratolins es col·loquen individualment en una gàbia estàndard (Macrolon, 35x35x25cm). La gàbia conté 6 peces de vidre (dimensions 1x1x1cm) espaiats uniformement formant un triangle (tres files de tres, dos i una peça per fila, situades a la zona esquerra de la gàbia) sobre una capa d'encenall de 5cm de gruix. Els ratolins es deixen a la gàbia amb marbres durant un període de 30 minuts. Un cop finalitzat el temps de la prova, es retira l'animal i es compta el nombre de peces: intactes (nombre de peces que mantenen la posició inicial), girades (nombre de

peces girades 90° o 180°), mig enterrades (nombre de peces almenys ½ enterrades per l'encenall) i enterrades (nombre de peces 100% enterrades per l'encenall).

Pes corporal (body weight) i funcions sensoriomotores (sensorimotor functions, SMT)

La condició física dels ratolins es va avaluar a partir del seu pes corporal i de les funcions sensoriomotores. La prova de les funcions sensoriomotores avalua diversos aspectes de les condicions físiques i sensorials dels animals, com són els reflexos visuals, l'equilibri, la coordinació motora, la força i la resistència. Aquest test està format per quatre proves consecutives:

Prova del reflex visual: el reflex visual i l'extensió reflexa de les potes posteriors es mesuren tres vegades sostenint en alt (40cm) a l'animal per la cua i aproximant-lo lentament cap a una superfície de color negra (32x32cm). L'animal ha d'estendre les potes abans de topiar amb la superfície (puntuació "1") i es pren el valor mitjà de les 3 puntuacions.

Proves de la barra de fusta i de la barra de metall: l'equilibri i la coordinació motora es van avaluar en dues tasques consecutives formades per una barra de fusta de secció quadrada (1,3cm d'amplada i 1m de llarg) i una altra barra cilíndrica de metall (1cm de diàmetre i 1m de llarg) ambdues dividides en 10 segments i col·locades a 40cm del terra. Cada prova constà de 2 assaigs de 20 segons. Durant la tasca, l'animal es col·loca en el centre de cada barra i es mesura la distància recorreguda i la latència de caiguda.

Prova del penja-robes: aquesta prova mesura la força muscular i la resistència, així com la prensibilitat i la coordinació motora de l'animal. A partir d'un penja-robes (2mm de diàmetre, 40cm de llarg) dividit en 8 segments de 5cm i elevat a 40cm del terra, es penja l'animal suaument de les seves potes del davant en el centre del penja-robes durant dos assaigs de 5 segons cadascun i un tercer assaig de 60 segons. En aquesta prova es mesura la distància recorreguda, el nombre d'elements de suport que rep i la latència a caure en cada assaig. El nombre d'elements de suport segueix la següent puntuació: caiguda (0), dues potes del davant (1), dues potes del davant + una pota o la cua (2), dues potes del davant + dues potes o una pota i la cua (3), quatre potes + la cua (4).

Rotarod

Per avaluar la funció de coordinació motora es va utilitzar una unitat de rotarod de 4 carrils automatitzats (Panlab, LE8200). L'aparell consta

d'un cargol giratori (diàmetre 7,3cm) i 4 compartiments individuals (carrils de 5cm d'amplada) per a cada animal. Cada ratolí es col·loca en un dels carrils i es mesura el temps que roman sense caure a una velocitat de rotació donada. A més, de manera automatitzada es registren el nombre de voltes, que serveix com a mesura indirecta de la distància recorreguda. En tots els casos, es va mesurar el nombre d'assaigs que necessita cada animal per aprendre a mantenir la coordinació motora sobre el rotarod i un cop assolit aquest objectiu, cada tasca es realitzà dues vegades per mesurar la distància recorreguda (nombre de voltes). La primera tasca es va fer a una velocitat baixa (5 rpm) realitzada en tots els animals i una segona, a una velocitat més ràpida (10 rpm) realitzada només en els animals que aconseguiren mantenir-se en el rotarod en la prova anterior. Els resultats s'obtingueren a partir dels valors mitjans entre els dos assaigs de cada prova.

Test de l'activitat motora circadiana o Circadian Activity test (ACT)

En aquest test es mesura l'activitat motora espontània durant un període de 23 hores (començant a les 15h, en períodes de 30 minuts), mitjançant un sistema de gàbies connectades simultàniament a un sistema informatitzat de mesura de l'activitat motora (Actitrack, Panlab, S.L., Barcelona). En cada gàbia (Macrolon, 35x35x25cm) coberta amb 5cm de gruix d'encenall i amb accés a aigua i menjar, es col·loca un animal. El pes dels animals va ser mesurat abans i després del test. El pes del menjar consumit també es va anotar.

Test del laberint aquàtic de Morris o Morris water maze test (MWM)

El laberint aquàtic de Morris és un test àmpliament utilitzat en les bateries conductuals ja que permet executar paradigmes d'aprenentatge i/o memòria de diverses tipologies, complexitats i patrons temporals.

El laberint consisteix en una piscina circular per a ratolins (Intex Recreation Corp CA, Estats Units; 91cm de diàmetre, 40cm d'alçada, 25°C, aigua opaca), situada en una sala de conducta pintada completament de negre. Durant les proves, l'animal s'introdueix delicadament dins de l'aigua des d'un punt cardinal diferent i alternat (est o oest). La tasca d'aprenentatge consisteix en trobar la plataforma (7cm de diàmetre) que pot estar visible (0,5cm sobre la superfície de l'aigua) i assenyalada amb una bandera de ratlles blanques i negres (5x8x15cm) o bé, estar amagada (1cm per sota de la superfície de l'aigua) segons sigui el paradigma d'aprenentatge guiat (en anglès *cue learning task*, CUE) o d'aprenentatge de la localització (en anglès *place learning task*, PT). Les pistes que permeten guiar a l'animal per trobar

al plataforma són internes (la bandera de la tasca d'aprenentatge guiat) o bé externes (una figura geomètrica blanca diferent penjada a cada paret). Els animals han de trobar la plataforma en un temps màxim d'un minut. Si durant aquest període, l'animal no aconsegueix trobar-la, l'experimentador el col·loca sobre de la plataforma durant 10 segons, el mateix temps que els animals que la troben hi romanen abans de ser retirats per l'experimentador. El protocol experimental té la següent pauta: un dia d'aprenentatge guiat seguit de quatre dies d'aprenentatge de localització de la plataforma i l'assaig de memòria final sense plataforma.

Cada sessió experimental consisteix en l'administració de 4 assaigs (3 o 4 assaigs per dia, depenent del protocol utilitzat en cada estudi), espaiats cada 30 minuts. Les variables que es mesuren són latència d'arribada a la plataforma i la distància recorreguda, que es calcula en base a imatges enregistrades utilitzant un sistema informatitzat (software Smart, Panlab, S.L., Barcelona). A partir d'aquestes dues variables es va calcular la velocitat de natació (cm/s) durant cada assaig. La representació de les trajectòries permet que l'experimentador analitzi les estratègies de navegació en funció de la finalitat (presència/absència d'estratègies de recerca), la direccionalitat (presència/absència d'estratègies dirigides a un objectiu) i la variabilitat (ús d'una o més estratègies).

Per a realitzar la prova de memòria a curt termini, una hora i mitja després de l'última sessió d'aprenentatge de localització, es retira la plataforma (*probe trial*). Aquesta prova consisteix en deixar que l'animal navegui durant un minut dins de la piscina i demostrï, amb el percentatge de permanència en cada un dels seus quadrants, el grau de memòria de la posició en la que estava la plataforma. Els quatre quadrants s'anomenen: de la plataforma (P), adjacent esquerre (en anglès *adjacent left*, Al), oposat (O) i adjacent dret (en anglès *adjacent right*, Ar). La precisió amb la que ho fa es mesura amb els *annulus crossings*, el nombre de creuaments de l'anella (2cm més àmplia de la mida real de la plataforma) que delimita l'antiga posició de la plataforma. En aquestes tasques és imprescindible l'ús del programa informatitzat.

A les anàlisis quantitatives (latència, distància i velocitat) s'hi afegeixen les qualitatives. És el cas de l'elecció que fa el ratolí d'una estratègia o una altra en el laberint aquàtic de Morris per resoldre les tasques. Les mesures quantitatives poden no reflectir clarament les diferències en l'elecció de l'estratègia per resoldre el problema, ja que no afecten necessàriament la latència d'escapament, la mesura

comunament utilitzada en el laberint d'aquàtic de Morris (Janus, 2004). En menor mesura, la distància sovint tampoc és capaç de reflectir les estratègies utilitzades. En el present estudi, es va utilitzar l'extensa classificació de les estratègies de natació caracteritzades per (Janus, 2004) per detectar canvis en la patró de natació dels ratolins 3xTg-AD. Es van comparar les freqüències de les estratègies de natació comunament observades i fàcilment identificables en cada un dels paradigmes del laberint aquàtic per tal de trobar els trets que distingeixen els dos genotips. D'aquesta manera, els camins descrits durant la natació de cada ratolí en cada assaig de les tasques d'aprenentatge guiat, de localització i en l'assaig de memòria final es van analitzar d'acord amb les següents estratègies:

Conductes de no cerca: Flotació: un estat d'inactivitat sense moviment cap endavant. La incidència i la durada d'aquesta activitat es va mesurar mitjançant una observació directa de l'experimentador. *Natació en cercles:* nedar en cercles tancats, sense mostrar un moviment direccional concret o seguint una estratègia de cerca aleatòria. Sovint és realitzada entre estratègia i estratègia.

Conductes de cerca: A) Estratègies no dirigides a un objectiu: Tigmotaxis (natació vora la paret): nedar al voltant de la paret de la piscina de manera persistent, que pot incloure visites esporàdiques al centre de la piscina. *Cerca aleatòria o a l'atzar:* nedar en tota l'àrea de la piscina en direcció ziga-zaga o descrivint cercles amplis. *Natació encadenada:* nedar descrivint cercles a una distància fixa de la paret, en la qual es troba la plataforma. *B) Estratègies dirigides a un objectiu* (organitzades per menor a major exactitud de l'estratègia): *Escaneig:* la ruta de cerca es restringeix a una zona limitada, sovint central. *Cerca focal:* l'animal busca en una àrea restringida de la piscina, propera a la zona on es troba la plataforma. El camí descrit es caracteritza per una natació directa cap a una àrea específica seguida per una densa concentració de girs i bucles superposats. Segons el quadrant on tingués lloc aquesta estratègia, la cerca focal es va classificar en cerca focalitzada en el quadrant objectiu o en el quadrant d'entrenament guiat. *Natació directa:* representat per un camí de natació recte o simple en direcció al quadrant que conté la plataforma d'escapament. En el progrés de la prova, vam detectar que els ratolins 3xTg-AD corregien l'estratègia triada, és a dir, la ruta de cerca s'inicia amb una estratègia 'no dirigida a un objectiu' que és corregida amb l'estratègia de 'natació directa' cap a la plataforma.

L'ús de cada estratègia de cerca es presenta com un percentatge d'incidències durant cada assaig sobre el conjunt del període

experimental analitzat. L'experimentador encarregat de codificar les estratègies desconeixia tant del genotip com la sessió i/o la seqüència de la prova. Alhora, es van classificar les estratègies en estratègies úniques (ús només d'una estratègia per assaig) o estratègies mixtes (ús de dos o més estratègies per assaig). La proporció dels assaigs utilitzant estratègies mixtes vs. úniques van ser analitzats en cada genotip.

Test de la sacsejada de la cua o Tail flick test (TFT)

En aquesta prova es col·loca la cua dels animals en aigua freda i es registra la latència de sacsejada de la cua com un indicador de la percepció sensorial relacionada amb el dolor. Es realitzen dos assaigs separats per 15 minuts. El valor mitjà entre els dos assaigs es pren com a resultat.

Supervivència (survival) i sistema immunològic perifèric (peripheral immune system)

En l'estudi III, la taxa de mortalitat es va registrar dels 6 a 13 mesos d'edat. Al final de l'experiment, la mida (pes en mg) i la mida relativa (% vs. pes corporal) de la melsa es va registrar com una mesura indirecta del possible deteriorament (es manifesta com a megalia) del sistema immunològic perifèric (Giménez-Llort *et al.*, 2012).

4.5 Estadística

Els resultats s'expressen com mitjana \pm error estàndard de la mitjana (SEM), percentatge (%) o incidència (n /total). Les anàlisis estadístiques es van dur a terme utilitzant el programa estadístic SPSS (versió 15.0). L'efecte dels factors estudiats: genotip (G), gènere (S), tractament (T) i temps (t), segons correspongui a cada estudi, es va obtenir mitjançant el model lineal general multivariant, seguit d'una anàlisi de la variància ANOVA i els contrastos *post hoc* de la prova Duncan. Les incidències es van valorar mitjançant la Chi quadrat o la F de Fisher, segons la mida de la mostra. Les correlacions entre diferents variables conductuals es van avaluar utilitzant la correlació de Pearson. Pel que fa a la conducta de navegació en el MWM, la freqüència de les conductes de no cerca i les estratègies de cerca va ser calculades com el nombre total d'assaigs que presenten aquesta determinada conducta en cada paradigma. Les diferències entre els diferents factors i les seves interaccions amb el factor temps en les diferents tasques MWM van ser analitzades amb l'ANOVA de mesures repetides (RMA). Es va utilitzar la prova t-aparellada per comparar les diferències entre dos assaigs. En tots els casos, $p < 0,05$ es va considerar estadísticament significatiu.

Estudi I

5. Estudi I. Caracterització de les conductes bizarres i de la conducta de valoració del risc en ratolins 3xTg-AD i NTg. Els efectes a llarg termini del handling postnatal

La neofòbia, les convulsions, l'augment de l'agressivitat i l'activitat locomotora, són exemples dels BPSD que ja han estat reproduïts en diversos models murins per a l'AD, mentre que altres són encara poc reportats a la literatura. Aquest és el cas de les estereotípies i els altres moviments aberrants, a causa de la seva baixa incidència i poca durada, així com l'especificitat de les condicions experimentals en què són quantificables. En el nostre laboratori, havíem observat conductes bizarres quan els animals eren avaluats en tests d'ansietat, el que suggeria que, en aquestes condicions, aquestes conductes podrien estar relacionades amb les estratègies per enfrontar-se a l'estrès. Un estudi preliminar va indicar que als 6 mesos d'edat, la incidència i la durada d'aquests comportaments en ratolins NTg eren prous per ser mesurables. En els ratolins 3xTg-AD, aquests comportaments estaven incrementats. Curiosament, l'edat de 6 mesos correspon a les etapes primerenques de la malaltia quan es detecta la β A intraneuronal en l'amígdala basolateral, fent que aquesta edat sigui interessant per caracteritzar aquestes conductes en ratolins 3xTg-AD i en la seva soca NTg. També vam estudiar el potencial beneficiós del handling postnatal, com a estratègia preventiva donat els seus efectes a llarg termini sobre perfils relacionats amb l'estrès. El factor gènere també va ser també considerat.

Aquest estudi ha donat lloc a l'article científic “Baeta-Corral, R., and Giménez-Llort, L. (2014). Bizarre behaviors and risk assessment in 3xTg-AD mice at early stages of the disease. *Behavioural Brain Research* 258, 97-105” que s'adjunta en forma d'annex.

5.1 Disseny experimental

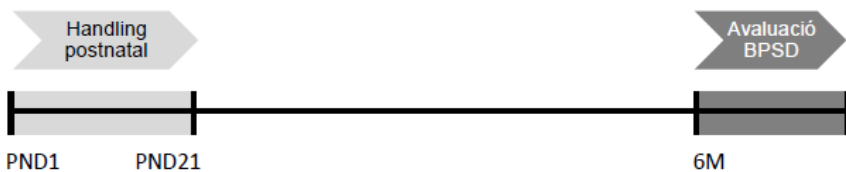


Figura A. Disseny experimental de l'Estudi I.

Els 77 subjectes experimentals vingueren de 30 ventrades, amb 6-8 cries de mitjana. Les ventrades van ser distribuïdes a l'atzar en els 4 grups experimentals segons el gènere: animals amb handling postnatal (15 ventrades) i sense (15 ventrades). El tractament de handling s'administrà als animals segons el protocol detallat a l'apartat de mètodes d'aquesta tesi doctoral. El disseny experimental va consistir en els següents grups experimentals per a cada genotip: mascles amb handling, femelles amb handling, mascles sense handling i femelles sense handling ($n=9-11$, en cada grup experimental).

La bateria de proves conductuals es va realitzar als 6 mesos d'edat i va consistir en el test de les cantonades seguit del test del camp obert (Dia 1) i el test de la caixa fosca/clara (Dia 4).

5.2 Resultats

El fenotip conductual mostrat als 6 mesos d'edat en els diferents tests i els efectes del PH sobre la conducta es presenten en la figura 1 i les taules 1-3.

Test de les cantonades

Tal i com s'il·lustra en la figura 1A, l'anàlisi factorial $2 \times 2 \times 2$ indicà una interacció entre els factors gènere \times genotip \times tractament [SxGxT, $F(1,69)=4,659$; $p<0,05$] en l'activitat horitzontal (nombre de cantonades visitades). Pel que fa a l'activitat vertical, ambdós gèneres del genotip 3xTg-AD [G, $F(1,69)=11,061$; $p<0,001$] i les femelles NTg [SxG, $F(1,69)=6,340$; $p<0,05$] van exhibir un menor nombre de rearings. No es van observar diferències en la latència del primer rearing (dades no presentades).

Test del camp obert

La seqüència d'esdeveniments conductuals desenvolupats en l'OF es detalla en les taules 1-3. Des de l'inici de la prova, es van trobar diferències dependent de genotip en la conducta anomenada de congelació o *freezing behavior* [G, $F(1,69)=5,662$; $p<0,05$] i en la presència de moviments bizarres [G, $F(1,69)=6,555$; $p<0,05$]. Tal i com es reflecteix en la taula 1, els animals transgènics van desenvolupar més conductes bizarres que els NTg, sobretot en el gènere femení.

Non-Handled Animals	Non-transgenic mice		3xTg-AD mice	
	Males	Females	Males	Females
Stereotyped stretching	-	+	-	+
Stereotyped rearings	+++	+++	+++	++
Backward movements	-	+	-	+++
Jumping	+	-	-	-

Handled animals	Non-transgenic mice		3xTg-AD mice	
	Males	Females	Males	Females
Stereotyped stretching	-	+	-	+
Stereotyped rearings	++	+	++	+
Backward movements	+	+	+	+
Jumping	-	-	-	-

Taula 1. Efectes a llarg termini del PH sobre les conductes bizarres mostrades pels ratolins c57bl/6x129 i 3xTg-AD a l'edat de 6 mesos en la prova del camp obert.

Per a cada un dels quatre comportaments bizarres, els resultats s'expressen com la incidència (percentatge,%) d'animals que mostren aquell determinat comportament: 0%: (-); 0-33%: (+); 33-66%: (++); 66-100% (+++). (Taula extreta de Baeta-Corral i Giménez-Llort, 2014).

Pel que fa al tractament, el PH va reduir la latència de la conducta de la congelació en tots els animals [T, $F(1,69)=6,055$; $p<0,05$] i la incidència dels animals que realitzaren qualsevol tipus de moviment bizzarre [T, $F(1,69)=20,075$; $p<0,001$]. Concretament, els rearings estereotipats es van reduir clarament en tots els grups [T, $F(1,69)=14,189$; $p<0,001$] fins al punt en què la incidència d'aquesta conducta va ser gairebé abolida en els ratolins 3xTg-AD [GxT, $F(1,69)=26,874$; $p<0,001$]. De la mateixa manera, el tractament també va reduir els retrocessos en les femelles [SxT, $F(1,69)=7,783$; $p<0,01$]. A més, es van trobar diferències de gènere en els estiraments estereotipats [S, $F(1,69)=9,507$; $p<0,01$], retrocessos [S, $F(1,69)=14,388$; $p<0,001$] i quan es van considerar les quatre conductes bizarres juntes [S, $F(1,69)=7,012$; $p<0,01$], on les femelles van mostrar una major incidència que els mascles.

Els ratolins 3xTg-AD van trigar més temps a arribar a la perifèria i a realitzar la conducta d'empolainament en comparació amb els ratolins NTg [G, $F(1,69)=6,208$; $p<0,05$ i G, $F(1,69)=27,767$; $p<0,001$, respectivament], que com a conseqüència, va donar lloc a un menor temps dedicat en aquesta conducta durant la prova [G, $F(1,69)=4,650$ $p<0,05$].

Pel que fa a l'activitat locomotora, tal i com s'observa en la figura 1B, durant la prova es van trobar una interacció de gènere x genotip en el component horitzontal [SxG, $F(1,69)=4,647$; $p<0,05$] sent els mascles més actius que les femelles [S, $F(1,69)=10,276$; $p<0,01$]. D'altra banda, ambdós sexes dels ratolins 3xTg-AD van mostrar un reduït nombre de creuaments (*crossings*) en comparació amb els ratolins NTg [G, $F(1,69)=12,484$; $p<0,001$]. A més, el tractament va augmentar aquest component horitzontal en tots els grups [T, $F(1,69)=12,464$; $p<0,001$]. En quant a l'activitat vertical, es va trobar una interacció de gènere x genotip [SxG, $F(1,69)=10,544$; $p<0,01$] on les diferències van ser apreciables en el genotip NTg, ja que les femelles van realitzar un menor nombre de *rearings* durant la prova en comparació amb els mascles [S, $F(1,69)=16,638$; $p<0,001$]. Aquesta reducció de l'activitat vertical també es va observar en ambdós sexes dels ratolins 3xTg-AD [G, $F(1,69)=62,334$; $p<0,001$].

En els animals 3xTg-AD, però no en els NTg, es van trobar coeficients de correlació de Pearson estadísticament significatius entre les diferents mesures de conductes relacionades amb l'ansietat i les bizarres ['conducta de congelació' i 'sortida del centre' i la presència d'estiraments estereotipats' $r<0,738$, $p<0,05$ i $r<0,686$, $p<0,05$, respectivament] i també ['sortida del centre' i 'entrada a la perifèria' i la presència de 'retrocessos' $r<-0,896$, $p<0,05$; i $r<-0,805$, $p<0,05$, respectivament].

Finalment, la defecació es va veure influenciada pel sexe i el genotip, on els mascles NTg i ambdós sexes dels ratolins 3xTg-AD van mostrar una resposta emocional major que les femelles [S, $F(1,69)=5,424$; $p<0,05$ i G, $F(1,69)=7,708$; $p<0,01$, respectivament]. També es van trobar diferències de gènere en la micció, sent els mascles el gènere que presentà una major incidència [S, $F(1,69)=8,288$; $p<0,01$].

Test de la caixa fosca/clara

En la figura 1C i en les taules 2 i 3 es mostren les diferències de gènere observades en la majoria dels paràmetres avaluats en aquesta prova. El nombre d'estiraments d'aproximació va ser major en les femelles [S, $F(1,69)=13,657$; $p<0,001$] alhora que el PH va potenciar aquestes

diferències de gènere en el genotip NTg tant en la latència [T, $t(1,16)=2,123$; $p<0,05$] com en el nombre d'episodis [prova de Duncan $p<0,05$].

La incidència dels animals que van entrar a la zona il·luminada va variar de 60-90% en els ratolins NTg i augmentà fins al 90-100% en els animals 3xTg-AD tot i que van trigar més temps en fer-ho [G, $F(1,69)=5,333$; $p<0,05$]. El nombre d'entrades a la zona il·luminada també varià entre genotips i gèneres [G, $F(1,69)=3,981$; $p<0,05$ i S, $F(1,69)=3,976$; $p<0,05$, respectivament]. D'altra banda, els mascles van passar més temps a la zona il·luminada [S, $F(1,69)=9,828$; $p<0,01$] realitzant una major activitat locomotora tant horitzontal com vertical en comparació amb les femelles [S, $F(1,69)=7,188$; $p<0,01$ i S, $F(1,69)=8,137$; $p<0,01$, respectivament], especialment en el genotip NTg [SxG, $F(1,69)=7,256$; $p<0,01$].

Tal i com mostren els coeficients de correlació de Pearson estadísticament significatius, en els animals NTg existeix una relació entre les variables d'estiraments d'aproximació i l'entrada a la zona il·luminada només en els mascles sense handling ['nombre d'estiraments d'aproximació' i 'latència d'entrada', $r<0,735$, $p<0,05$; 'Latència' i 'nombre' d'estiraments d'aproximació i 'temps en la zona il·luminada', $r<0,769$, $p<0,05$ i $r<-0,801$, $p<0,01$, respectivament]. En relació amb el genotip transgènic, la mateixa correlació entre aquests paràmetres es van trobar en els mascles ['latència d'estiraments d'aproximació' i 'temps en l'àrea il·luminada', $r<0,605$, $p<0,05$] i en les femelles ['nombre' i 'latència' d'estiraments d'aproximació i 'latència d'entrada', $r<0,608$, $p<0,05$ i $r<0,762$, $p<0,05$, respectivament] i 'nombre d'estiraments d'aproximació' i 'temps en l'àrea il·luminada', $r<0,712$, $p<0,05$]. A més, en tots els animals també es van correlacionar les variables relacionades amb l'activitat d'estiraments d'aproximació realitzades en la DLB i la presència de conductes bizarres i d'altres relacionades amb l'ansietat realitzades en l'OF ['conducta de congelació' i 'presència de moviments bizarres' i 'latència d'estiraments d'aproximació' $r<0,664$, $p<0,05$ i $r<0,715$, $p<0,05$, respectivament]. També ['conducta de congelació', 'sortida del centre' i 'entrada a la perifèria' amb 'nombre d'estiraments d'aproximació' $r<0,688$, $p<0,05$, $r<0,891$, $p<0,01$ i $r<0,819$, $p<0,01$, respectivament].

Finalment, es van trobar diferències de gènere i de genotip en la defecació total [S, $F(1,69)=4,968$; $p<0,05$ i G, $F(1,69)=33,199$; $p<0,001$, respectivament] i també en la presència d'orina [S, $F(1,69)=8,036$; $p<0,01$ i G, $F(1,69)=11,646$; $p<0,001$, respectivament].

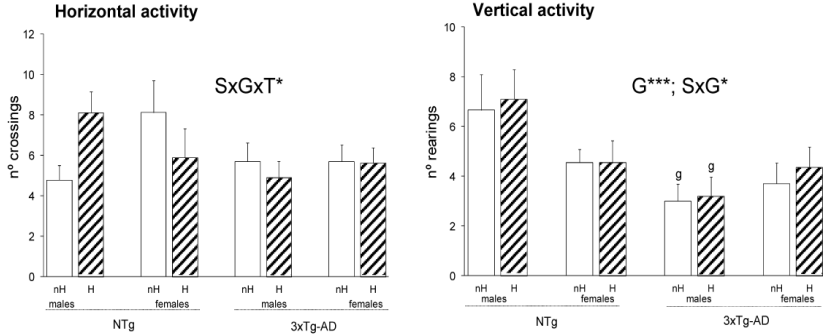
COPING WITH STRESS STRATEGIES	M NTg nH (n=9)	M NTg H (n=9)	M Tg nH (n=10)	M Tg H (n=10)	F NTg nH (n=9)	F NTg H (n=9)	F Tg nH (n=10)	F Tg H (n=11)	Statistics
BEHAVIORAL EVENTS									
Open field test									
<i>Latency of an event (s)</i>									
Exit of the center	7.6 ± 2.3	10.6 ± 5.6	13.7 ± 6.9	8.5 ± 1.4	15.1 ± 7.6	7.6 ± 1.2	12 ± 3.8	35.6 ± 24.3	n.s
Entrance to periphery	12.4 ± 2.2	21.3 ± 7.9	25.3 ± 6.4	26.5 ± 4.8	26.6 ± 7	24.4 ± 4.8	26.5 ± 6.9	82.1 ± 33.1 ^{sgt}	G*, SxGxT*
<i>Time of performance (s)</i>									
Freezing behavior	1.8 ± 0.3	0.7 ± 0.4	2.2 ± 0.6	1.6 ± 0.4	1.3 ± 0.6	0.6 ± 0.3	2.4 ± 0.8	1.4 ± 0.3	G*, T*
Dark-light box test									
<i>Latency of an event (s)</i>									
Entrance to the lit area	68.4 ± 35.4	96.7 ± 39.2	52.3 ± 28.2	38.4 ± 9.5	148.6 ± 46.7	101.7 ± 39	67.1 ± 27	49.1 ± 23.4	G*
<i>Time of performance (s)</i>									
Into the lit area	68.8 ± 17.2	54.6 ± 13.4	56.2 ± 13	43.7 ± 8	25.2 ± 8.9 ^s	28.6 ± 8.8	43.7 ± 7.4	31.7 ± 5.4	S**
<i>Total number (n)</i>									
Entries	5 ± 1.1	5.3 ± 1.7	5.6 ± 1	5.6 ± 1	2.4 ± 0.8	2.7 ± 0.6	4.9 ± 0.9	5.5 ± 1.1	S*, G*
BIZARRE BEHAVIORS									
Open field test									
<i>Incidence (%)</i>									
Any bizarre movement	77.8	55.6	90	20 ^{ttt}	100	66.7	90	45.5 ^{ttt}	T***
Stereotyped stretching	0	0	0	0	33.3	22.2	10	18.2	S**
Stereotyped rearings	77.8	55.6	90	10 ^{ggg}	88.9	44.4 ^{ttt}	60	9.1 ^{ttt}	G*, T***
Backward movements	0	22.2	0	10	33.3	22.2	80 ^{sss}	27.3 ^{ttt}	S***, SxT**
Jumping	11.1	11.1	0	0	0	0	0	0	n.s
<i>Total number (n)</i>									
Bizarre movement	8/36	8/36	9/40	2/40 ^{ttt}	14/36	8/36	15/40 ^{sss}	6/44 ^{ttt}	S**, T***
Stereotyped rearings	2 ± 0.5	1.7 ± 0.8	2.2 ± 0.7	0.1 ± 0.1 ^t	3.8 ± 1.3	0.9 ± 0.4 ^{tt}	2.4 ± 1	0.18 ± 0.2 ^{tt}	T***
RISK ASSESSMENT									
Dark-light box test									
<i>Stretch attendance</i>									
Early-SA incidence (%)	55.6	66.7	70	50	66.7	100 ^{s1}	60	54.6	S*, T*
Latency (s)	59.8 ± 31.8	32.3 ± 9.2	32 ± 13	38.4 ± 10.6	40.4 ± 19.3	11.3 ± 2.2 ^s	47.6 ± 20.9	25.7 ± 4.6	T*
Number (n)	6.2 ± 1.3	6.2 ± 1.2	5 ± 0.9	6.3 ± 0.7	10.1 ± 2.9	12.9 ± 1.7 ^s	7.8 ± 0.9	8.9 ± 1.7 ^s	S***

Taula 2. Efectes a llarg termini del PH sobre les estratègies de confrontació a l'estrès i conductes lligades a l'ansietat en ratolins 3xTg-AD i NTg als 6 mesos d'edat en el camp obert i la caixa fosca/clara. Els resultats s'expressen com a mitjana ± SEM o percentatge (%). M, mascles; F, femelles; NTg, no transgènic; Tg, transgènic; nH, sense handling; H, handling. ANOVA 2x2x2: S, efecte gènere; G, efecte genotip; T, efecte tractament; SxT interacció gènere x tractament; SxGxT interacció gènere x genotip x tractament * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. *Post hoc* de proves *t*-Student o Duncan ^s $p < 0,05$, ^{sss} $p < 0,001$ vs. el grup mascle corresponent; ^g $p < 0,05$, ^{ggg} $p < 0,001$ vs. el grup NTg corresponent; ^t $p < 0,05$, ^{tt} $p < 0,01$, ^{ttt} $p < 0,001$ vs. el grup sense handling corresponent. (Taula extreta de Baeta-Corral i Giménez-Llort, 2014).

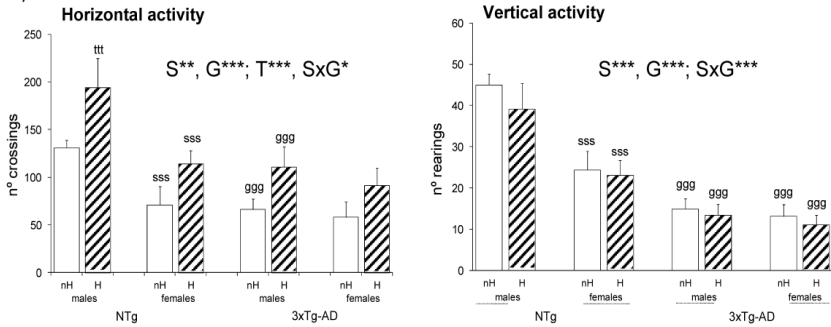
EMOTIONALITY BEHAVIORS		M NTg nH (n=9)	M NTg H (n=9)	M Tg nH (n=10)	M Tg H (n=10)	F NTg nH (n=9)	F NTg H (n=9)	F Tg nH (n=10)	F Tg H (n=11)	Statistics
SELF-GROOMING BEHAVIOR										
Open field test										
Latency (s)		152.2 ± 13.9	160.6 ± 17.2	213.6 ± 20.3 ^{ggg}	194.6 ± 20.3	120.1 ± 11.3	139.4 ± 8	229.5 ± 23.4 ^{ggg}	215.1 ± 23.4 ^{ggg}	G***
Duration (s)		7.6 ± 3.3	4.3 ± 0.4	4.1 ± 0.9	5.1 ± 0.6	5.9 ± 1.1	6.4 ± 1.4	3 ± 0.8	3.4 ± 1.2	G*
Dark-light box										
dark area	Latency(s)	206 ± 28	201 ± 17.7	192 ± 21.6	169 ± 16.4	170 ± 26.2	174 ± 32.8	213 ± 24.2	174 ± 31.9	n.s
	Duration (s)	3.4 ± 0.8	3.9 ± 0.9	4.5 ± 1.3	5.4 ± 0.8	3.8 ± 1.2	3.3 ± 0.9	3.1 ± 0.9	2.6 ± 0.5	n.s
lit area	Latency(s)	282.7 ± 17.3	282 ± 17.6	300 ± 0.0	290 ± 10	300 ± 0.0	300 ± 0.0	300 ± 0.0	300 ± 0.0	n.s
	Duration (s)	0.3 ± 0.3	0.4 ± 0.4	0 ± 0.0	0 ± 0.0	0 ± 0.0	0 ± 0.0	0 ± 0.0	0 ± 0.0	n.s
DEFECATION										
Open field test										
Total number (n)		3.2 ± 0.4	3.7 ± 0.6	4.6 ± 0.6	4 ± 0.7	2.6 ± 0.7	2 ± 0.5 ^s	3.9 ± 0.6	3.5 ± 0.5	S*, G**
Dark-light box										
Total number (n)		1.4 ± 0.4	2.3 ± 0.6	3.3 ± 0.5 ^{ggg}	3.1 ± 0.5	2.7 ± 0.5	1.4 ± 0.4	4.5 ± 0.4 ^{ggg}	4.5 ± 0.8 ^{ggg}	S*, G***
Into the lit area (n)		0.4 ± 0.2	0.6 ± 0.2	0.7 ± 0.2	0.3 ± 0.2	0.6 ± 0.3	0.1 ± 0.1	0.5 ± 0.3	0.4 ± 0.2	n.s
URINATION										
Open field test										
Incidence (%)		77.8	44.4	70	80	44.4	44.4	20 ^s	36.4 ^s	S**
Dark-light box										
Incidence (%)		22.2	33.3	90 ^{gg}	70	11.1	22.2	40 ^{ss}	27.3 ^{ss}	S**, G***
In the lit area (incidence, %)		22.2	22.2	30	10	0	0	20	9.1	n.s

Taula 3. Efectes a llarg termini del PH sobre les conductes associades a l'emotivitat en ratolins 3xTg-AD i NTg als 6 mesos d'edat en el camp obert i la caixa fosca/clara. Els resultats s'expressen com a mitjana ± SEM o percentatge (%). M, mascles; F, femelles; NTg, no transgènic; Tg, transgènic; nH, sense handling; H, handling. ANOVA 2x2x2: S, efecte gènere; G, efecte genotip; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. *Post hoc* de prova Duncan ^s $p < 0,05$, ^{ss} $p < 0,01$ vs. el grup mascle corresponent; ^{gg} $p < 0,01$, ^{ggg} $p < 0,001$ vs. el grup NTg corresponent. (Taula extreta de Baeta-Corral i Giménez-Llort, 2014).

A) CORNER TEST



B) OPEN FIELD TEST



C) DARK-LIGHT BOX TEST

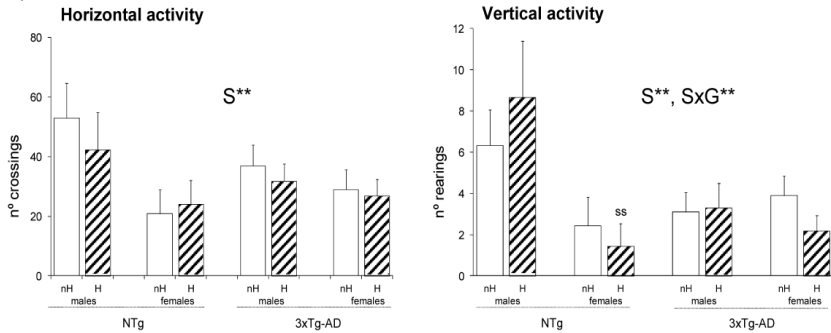


Figura 1. Efectes a llarg termini del PH sobre les conductes exploratòries en ratolins 3xTg-AD i NTg als 6 mesos d'edat. Les dades s'expressen com a mitjana \pm SEM. nH, sense handling; H, handling. ANOVA 2x2x2: S, efecte gènere; G, efecte genotip; T, efecte tractament; SxG, interacció gènere x genotip; SxGxT, interacció gènere x genotip x tractament * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. *Post hoc* de la prova Duncan^{SS} $p < 0,01$, ^{SSS} $p < 0,001$ vs. el grup mascle corresponent; ^g $p < 0,05$, ^{ggg} $p < 0,001$ vs. el grup NTg corresponent; ^{ttt} $p < 0,001$ vs. el grup sense handling corresponent (Figura extreta de Baeta-Corral i Giménez-Llort, 2014).

5.3 Discussió

En el present treball es caracteritzen les conductes bizarres observades sistemàticament en tests d'ansietat clàssics incondicionats com part dels símptomes tipus BPSD presents en els ratolins 3xTg-AD en les primeres etapes de la malaltia, així com la conducta de valoració del risc en aquests animals. També es va estudiar la capacitat que té l'estimulació sensorial tàctil durant les primeres etapes de la vida de contrarestar aquests símptomes.

Mascles i femelles de ratolins 3xTg-AD de 6 mesos d'edat i la seva soca NTg es van enfrontar successivament a tres ambients nous que comporten diferents condicions ansiogèniques: una lleu neofòbia en el CT, l'exposició directa a un camp obert i il·luminat a l'OF, i la possibilitat d'escollir entre dos compartiments en la prova de la DLB. En aquestes condicions experimentals, una anàlisi qualitativa i quantitativa detallada de les respostes conductuals identificà una sèrie d'esdeveniments que es van agrupar en tres dominis comportamentals: 1) Estratègies per fer front a l'estrès: la conducta de congelació, les conductes bizarres, la conducta de valoració del risc i l'elecció de les àrees protegides/no protegides; 2) L'activitat locomotora: activitats horitzontals i verticals; i 3) Conductes relacionades amb l'emotivitat: conducta d'empolainament, la defecació i la micció.

Les estratègies de 'lluita o vola' (*fight-to-flight*) per fer front a l'estrès van ser les primeres respostes observades en el CT i l'OF. Tots els animals, independentment del seu gènere i genotip, van passar els primers segons completament immòbils. Després d'aquest estat inicial de congelació i abans d'abandonar el centre de l'aparell, alguns animals també van mostrar conductes bizarres, anomenades: 'estiraments estereotipats', 'aixecaments estereotipats', 'caminar cap enrere' i 'salts'. Aquestes conductes horitzontals i verticals es van considerar estereotípies motores repetitives anòmales o aparentment sense sentit (Powell, *et al.*, 1999; Presti *et al.*, 2004) i en aquests animals estudiats, és possible que representin diferents tipus d'estratègies de tipus 'lluita o vola' per fer front l'estrès. En realitat, aquestes conductes han estat escassament descrites per la seva baixa incidència en rosegadors adults joves (Powell *et al.*, 2000) i la major part de la literatura es refereix a la seva elicitació després d'actuacions farmacològiques (Gulati *et al.*, 1988; Randrup *et al.*, 1988; Giménez-Llort *et al.*, 1998; Kitanaka *et al.*, 2010; Van Swearingen *et al.*, 2012). Per raons similars, la curta durada de la prova del CT fa que siguin difícil de mesurar. Contràriament, en l'OF, tal i com les nostres dades preliminars suggerien, el desenvolupament d'aquestes conductes als 6 mesos d'edat va ser prou

freqüent com per ser quantificades, no només quan aquestes conductes es van agrupar en una categoria única, sinó també quan es van considerar de manera individual. Per exemple, en les femelles, els estiraments estereotipats van ser la conducta bizarra més visible. El desenvolupament d'aquests comportaments en el centre de l'aparell implicà un retard en entrar a la perifèria, cosa que va fer difícil observar clares diferències en la tigmotaxis (preferència per les àrees protegides), ja que només es van trobar en les femelles 3xTg-AD tractades. Els presents resultats indiquen l'edat de 6 mesos com a un punt en el temps interessant no només per estudiar conductes bizarres espontànies, sinó també pel seu component de gènere i la seva modulació mitjançant les condicions ambientals durant la infantesa, com ara el PH.

Aquest fet té especial interès en el cas dels ratolins 3xTg-AD ja que aquesta edat és coneguda per modelar les primeres etapes de la malaltia quan només es detecta immunoreactivitat intra-neuronal a β A (Oddo *et al.*, 2003a). A nivell clínic, les alteracions greus de conducta s'han correlacionat amb l'augment de la dopamina (DA) i una reducció dels receptors estriatals D2 en l'estriat dels pacients amb AD. D'altra banda, els estímuls estressants són coneguts per donar lloc a un augment de les concentracions de DA extracel·lular en el mesolímbic, el mesostriatal i les vies mesocorticals dopaminèrgiques (Pani *et al.*, 2000; Giorgi *et al.*, 2003), així com l'augment de l'activitat de l'eix hipotalàmic-pituitari-adrenal (HPA) (Von Holst, 1998). Curiosament, la desregulació de la resposta a estrès de l'eix HPA és una altra característica de l'AD a nivell neuroendocrí (Maeda *et al.*, 1991).

De manera similar, altres patrons conductuals espontanis, invariables i repetitius observats en gàbies d'estabulació i dispositius automatitzats s'han descrit en ratolins transgènics APP23 (Lalonde *et al.*, 2002), PS1-A245E (Lalonde *et al.*, 2003b) i ratolins TgCRN8 (Ambreé *et al.*, 2006). Per exemple, els ratolins APP23 sovint fan continus alçaments i salts contra les parets de la seva gàbia. En aquests models, no només els nivells de DA elevats, coneguts per ser capaços de provocar estereotípies en els rosegadors (Mason, 1991), sinó que també la serotonina i els opioides s'han proposat com a bases neuroquímiques dels comportaments estereotipats (Cabib, 1993; Pappert *et al.*, 1998; Garner i Mason, 2002). En animals vells 3xTg-AD (Giménez-Llort *et al.*, 2008) i ratolins TgCRN8 (Touma *et al.*, 2004) s'ha vist una hiperactivitat de l'eix HPA dependent de l'edat i sexe. En el model 3xTg-AD, conductes relacionades amb una activitat motora aberrant es van correlacionar amb les elevades concentracions de corticosterona, el

que suggereix que en aquests animals hi ha una menor capacitat per fer front a l'estrès (Ambreé *et al.*, 2006). D'altra banda, les conductes bizarres podrien estar causades indirectament per la patologia de l'AD en l'hipocamp i l'amígdala, que es veu agreujada per la hiperactivitat de l'eix HPA/cascada glucocorticoide (Sapolsky *et al.*, 1986). De fet, aquí es presenta l'increment de les conductes bizarres en ratolins 3xTg-AD als 6 mesos d'edat, la mateixa edat en què ja s'ha demostrat un paper deleteri de l'acumulació de β A intraneuronal en les neurones piramidals glutamatèrgiques de l'amígdala basolateral (BLA) en les respostes emocionals dependents de l'amígdala (España *et al.*, 2010).

Aquesta anàlisi també proporciona noves evidències sobre l'existència de símptomes tipus BPSD en ambdós sexes dels ratolins 3xTg-AD en les primeres etapes de la malaltia (Giménez-Llort *et al.*, 2006, 2010; García-Mesa *et al.*, 2011). Per a qualsevol dels dominis conductuals estudiats, la prova de l'OF va resultar ser la més sensible a l'hora de mostrar les diferències de genotip i de gènere, així com per demostrar, per primera vegada, els beneficis del PH. En aquesta prova conductual, els ratolins 3xTg-AD van mostrar un increment de les estratègies de 'lluïta o vola' per fer front a l'estrès en comparació amb els animals NTg. Concretament destacaren les conductes de congelació i les bizarres, sobretot les de component estereotipat van ser les que van mostrar una major incidència. A més, la correlació negativa de les conductes de congelació i bizarres amb l'activitat locomotora horitzontal va demostrar que aquestes conductes estan fortament involucrades en la reducció de la locomoció descrita en ratolins 3xTg-AD davant condicions ansiogèniques (Giménez-Llort *et al.*, 2006, 2010; García-Mesa *et al.*, 2011)

El handling postnatal, generalment utilitzat per estudiar els efectes dels factors ambientals en el desenvolupament i la plasticitat durant la ontogènia, també és capaç d'induir efectes positius a llarg termini en una diversitat de respostes conductuals i neurobiològiques (revisat per Holmes *et al.*, 2005). En aquest sentit, les accions a llarg termini del PH s'han reportat en la neurotransmissió serotoninèrgica, dopaminèrgica i la GABAèrgica, així com en l'AMP cíclic i en els sistemes de segons missatgers PLC. També per contrarestar danys excitotòxics glutamatèrgics i els canvis cognitius o histològics relacionats amb edat. No obstant, els efectes del PH en les respostes de l'eix HPA són probablement els que proporcionen els resultats més rellevants a nivell funcional (Anisman *et al.*, 1998; Levine, 2000; Holmes *et al.*, 2005) fins al punt que el PH és capaç de modificar trets comportamentals de tipus ansios heretats genèticament (Aguilar *et al.* 2004).

D'acord amb això, el present estudi mostra que el primer efecte beneficiós del PH observable a llarg termini en els ratolins 3xTg-AD i NTg va ser l'atenuació de la conducta de congelació. Aquest efecte s'ha observat sovint com un benefici de PH en les estratègies de 'lluïta o vola' per fer front a l'estrès en rates (Meaney *et al.*, 1991) i ratolins (Sternberg *et al.*, 2003). Aquí també hem demostrat, en ambdós genotips i gèneres, que el PH va ser capaç de contrarestar les conductes bizarres. Wakshlak i Weinstock (1990) van reportar un efecte similar del PH en les estereotípies induïdes farmacològicament. A més, estudis reportats anteriorment han demostrat que les conductes bizarres obtingudes espontàniament sota condicions ambientals restringides es poden reduir quan els animals es transfereixen a un ambient enriquit (Gross *et al.*, 2012). Per tant, les conductes bizarres observades en condicions ansiogèniques en soques estàndard o emfatitzades en models animals semblen ser conductes idònies per a ser millorades a través d'intervencions durant les primeres etapes de la vida, com per exemple, el PH.

La conducta d'estiraments d'aproximació, considerada com una conducta per avaluar el risc d'entrar a l'àrea il·luminada en la DLB (Bourin i Hascoet, 2003), es va observar en la majoria dels animals estudiats. Tant la latència com el nombre d'episodis d'aquest comportament van estar influenciats pel gènere i incrementats pel PH. Aquest fet és interessant perquè altres estudis han trobat també uns efectes similars del PH en l'increment de les diferències relacionades amb el gènere en la soca c57bl/6 amb susceptibilitat a una malaltia degenerativa (Columba-Cabezas *et al.*, 2009). Les dues variables que mesuren la conducta d'estiraments d'aproximació van mostrar que aquest comportament d'avaluació del risc es correlaciona inversament amb el temps de permanència a la zona il·luminada, és a dir, amb el grau d'ansietat dels animals. Això és important a tenir en compte ja que estudis realitzats en el nostre laboratori han demostrat prèviament que en ambdós gèneres de rates psicogenèticament seleccionades per a alta i baixa ansietat (rates RHA/Verh-I i RLA/Verh-I, respectivament), així com en la població heterogènia de rates N/NiH-HS, l'avaluació del risc era independent de comportaments de tipus ansiós (Aguilar *et al.*, 2004; López-Aumatell *et al.*, 2008). D'acord amb el treball previ (Giménez-Llort *et al.*, 2010) les diferències de gènere en l'ansietat observades en el grup NTg van desaparèixer en el genotip 3xTg-AD, a causa de la conducta desinhibitòria de les femelles 3xTg-AD. D'altra banda, els efectes bidireccionals del PH potenciant l'avaluació del risc i reduint les conductes de congelació i bizarres evidencien les seves accions en els diferents substrats neuroanatòmics involucrats en les estratègies per fer

front a l'estrès. Pel que fa a l'ús d'aquest tipus d'esdeveniment durant l'ontogènia, estudis recents corroboren efectes beneficiosos similars obtinguts en l'adultesa davant situacions d'enfrontament amb l'estrès (Bouffleur *et al.*, 2012; Marcolin *et al.*, 2012).

En totes les tres proves conductuals, els rearings van mostrar consistentment un dimorfisme sexual mentre que la reducció en els dos components de l'activitat locomotora manifestà els efectes de genotip. Sorprenentment, el present treball destaca que els efectes del PH es limiten a la locomoció horitzontal, la qual és especialment sensible a la presència d'ansietat (Roy i Chapillon, 2004). En canvi, l'activitat vertical, que es considera que reflecteix millor la conducta exploratòria (Giménez-Llort *et al.*, 1997; Colorado *et al.*, 2006), no es va veure modificada. Curiosament, aquesta activitat exploratòria vertical es va correlacionar positivament amb els rearings estereotipats, que van ser contrarestats pel PH. Per tant, sembla que els beneficis de PH estan majoritàriament relacionats amb l'ansietat, però no a l'activitat exploratòria vertical, *per se*. Aquest fet suggereix que l'eficàcia variable del PH està relacionada amb les seves accions sobre diferents substrats neuroanatòmics.

Finalment, les conductes de component emocional, com són les conductes d'empolainament, la defecació i la micció, també es van trobar fortament influenciades pels factors gènere i genotip. En general, l'efecte del gènere, trobat de manera consistent en tots els dominis conductuals, posa de manifest la importància de considerar aquest factor en els dissenys experimentals, per tal de detectar tots els efectes en el volum total de la població, tant en presència com absència de malaltia.

5.4 Conclusions

Les conclusions de l'Estudi I per a la *Caracterització de les conductes bizarres i la valoració del risc en ratolins 3xTg-AD i NTg i els efectes a llarg termini del handling postnatal*, en ambdós gèneres, als 6 mesos d'edat, van ser les següents:

1. Les conductes bizarres en el genotip 3xTg-AD als 6 mesos d'edat són BPSD primerencs conspicus i mesurables. Es classifiquen en aixecaments estereotipats, estiraments estereotipats, caminar cap enrere i salts.
2. El patró de conductes bizarres en ratolins 3xTg-AD difereix de la dels animals NTg i es correlaciona amb altres comportaments d'ansietat, la locomoció i l'emotivitat.

3. La majoria dels esdeveniments conductuals estudiats depenen del gènere. Sent les femelles el gènere més adequat per estudiar les conductes bizarres i la conducta de valoració del risc.
4. A llarg termini, el handling postnatal permet reduir la conducta de petrificació i les conductes bizarres, mentre que potencia la conducta de valoració del risc.
5. A més, els efectes del handling són selectius, actuant sobre les estratègies per fer front a l'estrès, però no exercint cap efecte sobre l'activitat exploratòria *per se*, com ho és l'activitat vertical.

Estudi II

Fase 1

6. Estudi II. Fase 1. Caracterització de les estratègies de navegació en el laberint aquàtic de Morris en ratolins 3xTg-AD i NTg

Per caracteritzar les estratègies de navegació en el laberint aquàtic de Morris en ratolins 3xTg-AD i NTg es van fer servir animals de 13 mesos d'edat, que es corresponen amb les etapes avançades de la malaltia quan ja hi ha plaques de β A i comença la formació dels cabdells neurofibril·lars (Oddo *et al.*, 2003b). En aquest context, es va analitzar els diferents patrons de navegació que presenten els animals 3xTg-AD i NTg davant diferents paradigmes proposats en aquest test. Per dur a terme aquest propòsit, es van estudiar les diferents estratègies de natació establint criteris en funció de la finalitat (presència/absència d'estratègies de recerca), la direccionalitat (presència/absència d'estratègies dirigides a un objectiu) i la variabilitat (ús d'una o més estratègies).

Aquest estudi ha donat lloc a un manuscrit que està en procés de revisió al *Behavioral Neuroscience*, amb resposta ja enviada als primers comentaris dels referees. “Baeta-Corral, R., and Giménez-Llort, L. (2014). Persistent hyperactivity and distinctive strategy features in the Morris Water Maze in 3xTg-AD mice at advanced stages of disease”, que s'adjunta en forma d'annex.

6.1 Disseny experimental

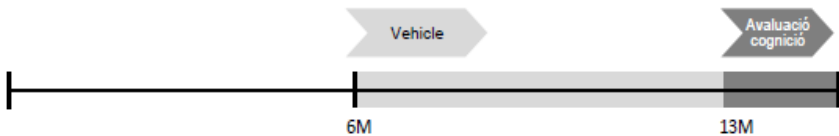


Figura B. Disseny experimental de l'Estudi II. Fase 1.

Els 16 subjectes experimentals vingueren de 7 ventrades, amb 6-8 cries de mitjana. Els mascles de les ventrades van ser distribuïts en els 2 grups experimentals: animals NTg (3 ventrades) i animals 3xTg-AD (4 ventrades) amb 8 animals per grup experimental.

El protocol que es va utilitzar en aquest estudi (Giménez-Llort *et al.*, 2007) segueix la següent pauta: un dia d'aprenentatge guiat i quatre dies de localització de la plataforma seguit per un assaig de memòria final (*probe trial*) sense plataforma.

6.2 Resultats

Les figures 2 i 3 il·lustren les anàlisis quantitatives de les variables de temps, distància i velocitat en els diferents paradigmes del laberint aquàtic de Morris. Les anàlisis qualitatives de les conductes de no cerca i les estratègies de cerca es representen en les figures 4 i 5.

Anàlisis quantitatives

Com es mostra a la figura 2, les diferències de genotip trobades en la latència mitja de la tasca d'aprenentatge guiada [Fig. 2A, G, $F(1,15)=6,289$; $p<0,05$] es van perdre quan s'utilitzà la variable distància [Fig. 2C, G, $F(1,15)=0,001$; $p=0,975$, *n.s.*]. En la tasca de localització, l'efecte 'temps' va indicar la presència d'un procés d'adquisició en ambdues variables, la latència mitja [Fig.2A, RMA, T, $F(3,42)=22,805$, $p<0,001$] i la distància recorreguda [Fig.2C, RMA, T, $F(3,42)=31,585$, $p<0,001$]. Només una anàlisi més detallada com la que s'obté analitzant les dades "assaig per assaig" i que avalua la memòria a curt termini (Fig.2B i 2D), van mostrar interaccions de genotip x dia [PT1, PT2 i PT3, TxG, totes les $F(3,42)>3,036$, $p<0,05$] i algunes diferències de genotip en alguns assaigs, majoritàriament per a la variable de latència [G, totes les $F(1,15)>4,552$, $p<0,05$]. El nivell d'adquisició assolit al final de la tasca de localització va ser similar en ambdós genotips [latència, PT4.T4, G, $F(1,15)=4,354$; $p>0,05$, *n.s.*; distància recorreguda, PT4.T4, G, $F(1,15)=0,642$; $p>0,05$ *n.s.*]. Els ratolins 3xTg-AD van mostrar una velocitat de natació consistentment més ràpida en comparació als animals NTg tant en la tasca d'aprenentatge guiat [RMA, G, $F(1,15)=39,355$; $p<0,001$], com en la de localització [RMA, G, $F(1,15)=29,593$; $p<0,001$] (Fig.2F). Aquests resultats es van mantenir fins i tot quan el temps emprat en la flotació es va tenir en compte a l'hora de calcular la velocitat total (dades no mostrades). En l'assaig de memòria final (Fig.3), es mesura la memòria com la preferència pel quadrant que contenia la plataforma i la precisió per arribar a aquesta (nombre de creuaments en la zona exacta on es trobava la plataforma). Aquí, de nou, les variables de temps i distància no van ser suficientment sensibles per detectar diferències de genotip, mentre que sí que es van observar en la velocitat de natació [G, $F(1,15)=7,594$; $p<0,05$]. En general, els resultats quantitativs reflecteixen que, en aquestes condicions experimentals, els resultats cognitius es van veure fortament condicionats per les diferències de genotip en la velocitat de natació.

TASQUES D'APRENTATGE GUIAT I DE LOCALITZACIÓ

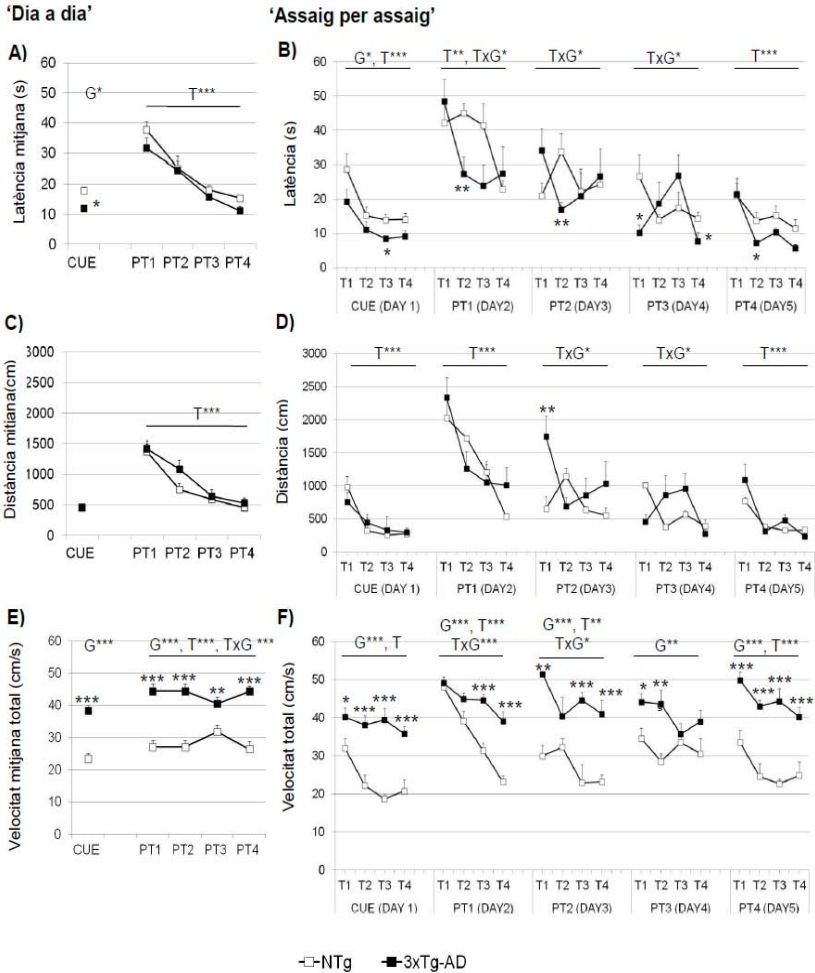


Figura 2. Anàlisi quantitativa de les tasques d'aprenentatge guiad i de localització avaluades en la prova del MWM en ratolins 3xTg-AD i NTg als 13 mesos d'edat. La figura mostra les anàlisis 'dia a dia' (esquerra) i 'assaig per assaig' (dreta). Les dades s'expressen com a mitjana \pm SEM. RMA: G, efecte genotip; T, efecte temps; TxG, interacció 'temps x genotip'; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ prova *t*-Student: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. el grup NTg.

ASSAIG DE MEMÒRIA FINAL

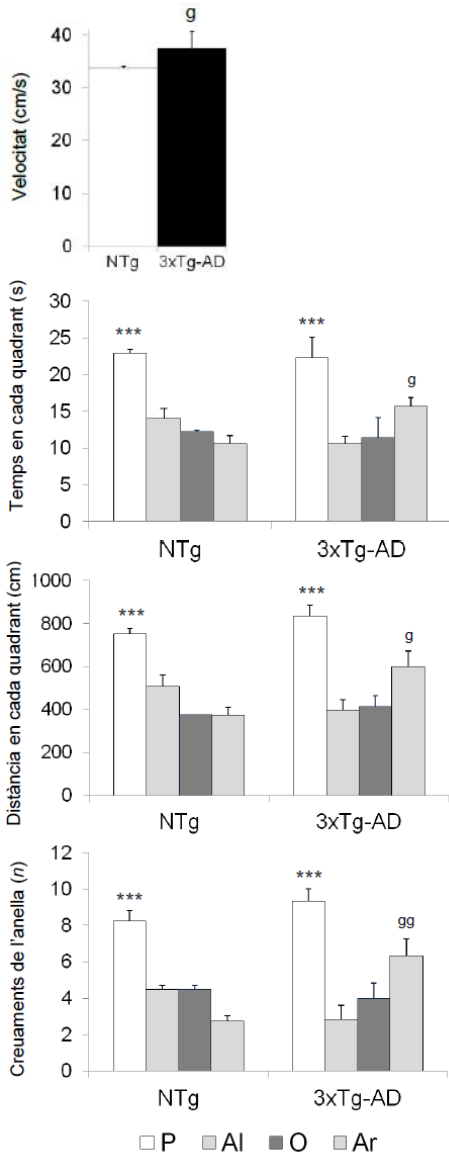


Figura 3. Anàlisi quantitatives de l'assaig final avaluat en la prova del MWM en ratolins 3xTg-AD i NTg als 13 mesos d'edat. Les dades s'expressen com a mitjana \pm SEM del temps, distància i creuaments de l'anella en els quadrants de la plataforma (P), adjacent esquerre (AI), oposat (O) i adjacent dret (Ar). Velocitat de navegació en aquesta prova. Prova de *t*-Student: ^g $p < 0.05$, ^{gg} $p < 0.01$ vs. el grup NTg. ANOVA, *** $p < 0.001$ P vs. tots els altres quadrants.

Anàlisis qualitatives

Les característiques qualitatives de les estratègies de navegació van ser analitzades en els tres paradigmes de laberint aquàtic d'acord a l'existència o no d'una estratègia de cerca i van ser classificades de la següent manera:

Les conductes no relacionades amb la cerca (Fig.4A) en els ratolins NTg c57bl/6 es van caracteritzar per una elevada freqüència de flotació al llarg de la prova [G, $F(3,42)=10,836$; $p<0,01$] mostrant un efecte 'temps' [T, $F(3,42)=4,191$; $p<0,01$], 'genotip' [G, $F(1,14)=10,078$; $p<0,001$] i una interacció 'temps x genotip' [TxG, $F(3,42)=2,957$; $p<0,05$] en la durada d'aquesta conducta. En canvi, els animals 3xTg-AD van realitzar una major natació en cercles en les tasques d'aprenentatge guiat i de localització [ambdues, G, $F(1,15)>6,266$, $p<0,05$]. Curiosament, es va trobar un efecte 'temps' durant la tasca de localització [T, $F(3,42)=3,212$, $p<0,05$] com a resultat de la reducció d'aquesta conducta al llarg de la prova (Fig.4B).

Les estratègies de recerca exhibides van ser analitzats per a cada paradigma. Durant la primera experiència en el laberint aquàtic, en la tasca d'aprenentatge guiat, l'estratègia de cerca a l'atzar va ser observada en la major part dels animals 3xTg-AD i NTg. En els següents assaigs, tots els animals van canviar progressivament la seva cerca a l'atzar cap a una estratègia dirigida a un objectiu (Fig.4D).

Al dia següent, l'inici de la tasca d'aprenentatge de la localització va comportar el canvi de posició i l'ocultació de la plataforma. En el primer assaig, la majoria dels ratolins NTg van nedar 'directament' a la posició de la plataforma anterior, contràriament als ratolins 3xTg-AD que van utilitzar una estratègia de tipus no dirigida a un objectiu, sobretot les d'encadenament' o 'atzar' [la prova exacta de Fisher; $p<0,05$]. Al no trobar la plataforma en la posició esperada, la majoria d'animals NTg van canviar la seva estratègia per la natació 'a l'atzar' [$F(7,56)=7,000$ vs. totes les altres estratègies, $p<0,001$], mentre que en el genotip transgènic, l'encadenament' va ser l'estratègia predominant [$F(7,56)=2,970$ vs. totes les altres estratègies, $p<0,01$]. Per tant, els resultats indiquen que durant la primera sessió d'aquest nou paradigma, el procés d'adquisició de la nova posició de la plataforma oculta implica l'ús de més d'una estratègia en el mateix assaig, és a dir, l'ús d'estratègies mixtes. A més, amb l'avanç de les sessions, es van trobar diferències significatives de genotip de la segona a la quarta jornada (Fig.4C i 4D) quan les dades va ser considerades de la següent manera: 1) la proporció d'animals usant estratègies 'mixtes' vs. 'úniques' [$\chi_{(2)}^2=10,093$; $p<0,001$], 2) estratègies 'no dirigides a un objectiu' vs.

'dirigides a un objectiu' [$\chi_{(2)}^2=11,443$; $p<0,001$], 3) la recerca de la plataforma en la ubicació corresponent a l'entrenament guiat [prova exacta de Fisher; $p<0,01$]. En particular, els animals NTg van mostrar una major proporció d'estratègies 'úniques' i 'dirigides' a un objectiu' sent la 'natació directa' i la 'cerca focalitzada' les predominants [$F(7,56)=39,111$, ambdues vs. totes les altres, $p<0,001$]. En canvi, els ratolins 3xTg-AD van persistir utilitzant estratègies 'mixtes' i 'no dirigides a un objectiu' sent l'encadenament' i la 'natació a l'atzar' les més comuns [$F(7,56)=12,888$ ambdues vs. totes les altres, $p<0,001$] (Fig.5). No obstant, amb el progrés de la tasca d'adquisició, aquest pobre rendiment cognitiu mostrat pels ratolins 3xTg-AD va millorar gràcies a l'entrenament ja que van mostrar una correcció de la seva trajectòria de navegació en PT3 i PT4 ['natació corregida' prova exacta Fisher; $p<0,05$].

A l'assaig de memòria final, tots els animals (100%) van nedar 'directament' a l'àrea on es trobava la plataforma oculta. Al no aconseguir-ho, els ratolins NTg van alternar diferents tipus d'estratègies mentre que els animals 3xTg-AD van mostrar persistència en la conducta.

CONDUCTES DE NO CERCA I ESTRATÈGIES DE CERCA

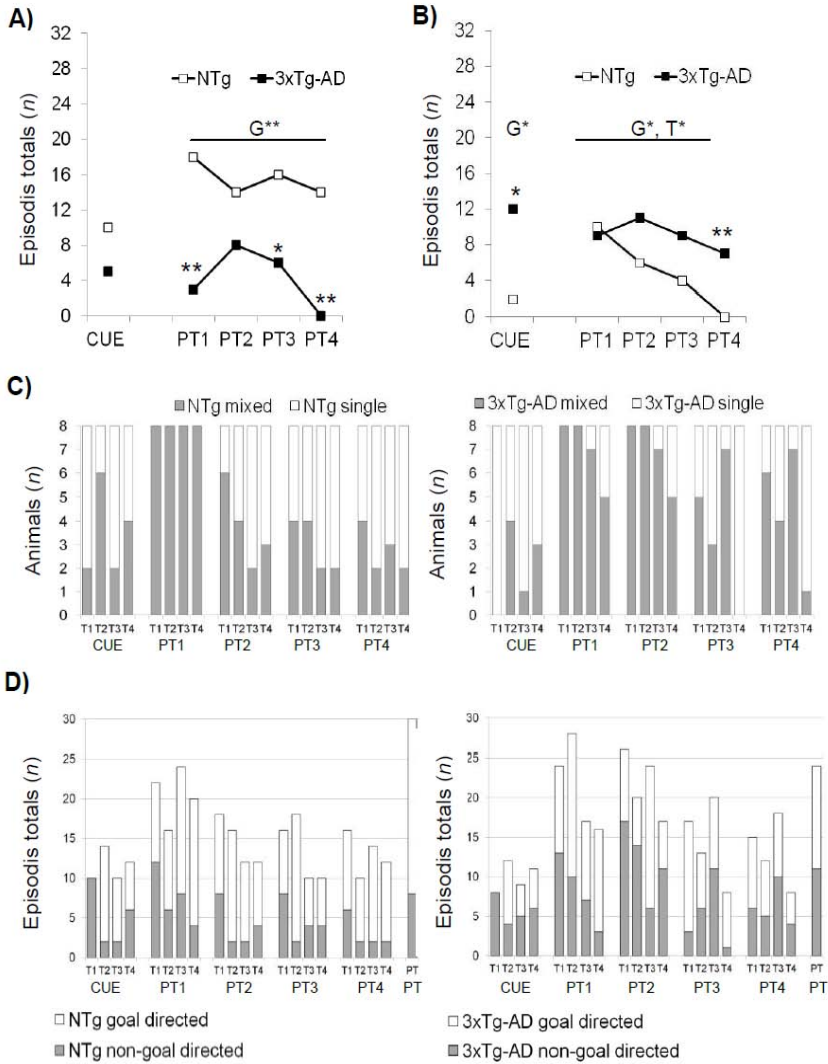


Figura 4. Anàlisi qualitatives de les conductes de no cerca i estratègies de cerca avaluades 'assaig per assaig' en el MWM en ratolins 3xTg-AD i NTg als 13 mesos d'edat. La figura representa la conducta de flotació (A), la natació en cercles (B), ús d'estratègies úniques vs. mixtes (C) i estratègies dirigides vs. les no dirigides a un objectiu (D). Les dades s'expressen Pel nombre total d'episodis o animals (n). RMA: G, efecte genotip; T, efecte temps; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. Post-hoc: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ vs. el grup NTg.

ESTRATÈGIES DE CERCA

	ANÀLISIS GLOBAL	ANÀLISIS DETALLADA				
CUE T1						
	'cerca a l'atzar'					
PT1 T1						
	'cerca a l'atzar'	'natació directa' en el quadrant d'aprenentatge guiat	'escaneig'	'cerca a l'atzar'		
PT2 T1						
	'natació directa'					
PT3 T1						
	'natació directa'					
PT4 T1						
	'natació directa'					
MEMÒRIA FINAL						
	'cerca a l'atzar'	'natació directa'	'cerca focal'	'escaneig'	'natació encadenada'	

	ANÀLISIS GLOBAL	ANÀLISIS DETALLADA				
CUE T1						
	'cerca a l'atzar'					
PT1 T1						
	'cerca a l'atzar'	'cerca focal' errònia	'natació encadenada'	'natació encadenada' en el quadrant d'aprenentatge guiat		
PT2 T1						
	'cerca a l'atzar'	'cerca a l'atzar'	'natació encadenada'	'natació encadenada'	'escaneig' amb 'natació en cercles' en el quadrant d'aprenentatge guiat	'tigmiotaxis'
PT3 T1						
	'cerca a l'atzar'	'cerca focal'	'escaneig' en el quadrant d'aprenentatge guiat	'estratègia corregida'		
PT4 T1						
	'cerca a l'atzar'	'cerca a l'atzar'	'natació en cercles'	'estratègia corregida'		
MEMÒRIA FINAL						
	'cerca a l'atzar'	'natació directa'	'natació encadenada'	'natació encadenada'	'natació encadenada'	

Figura 5. Estratègies de natació representatives mostrades en els animals NTg (a dalt) i 3xTg-AD (a baix) als 13 mesos d'edat en els paradigmes del MWM. Anàlisi global (esquerra) i anàlisi detallada (dreta) on s'il·lustren totes les estratègies realitzades per un animal representatiu de cada genotip. Cercle obert: posició de la plataforma en l'aprenentatge guiat, cercle tancat: posició de la plataforma en la tasca de localització.

6.3 Discussió

Aquest estudi proporciona, per primera vegada, una caracterització general i integral, tant del domini conductual cognitiu com el perfil BPSD (incloses les estratègies de recerca) en ratolins 3xTg-AD de 13 mesos d'edat, en el laberint aquàtic de Morris. Les mesures quantitatives van detectar diferències de genotip en la latència d'escapament mitjana en la tasca d'aprenentatge guiat, així com en la velocitat de natació exhibida en totes les tasques realitzades. La majoria d'aquests resultats confirmen la presència d'un fort perfil BPSD mentre que latència d'escapament i la distància recorreguda van ser variables menys precises a l'hora de reflectir el deteriorament associat a l'AD. L'augment de la velocitat de natació trobat en tots els paradigmes, independentment de la dificultat de la tasca, confirma l'existència d'un patró d'hiperactivitat constant com es mostra també en l'actimetria (Giménez-Llort *et al.*, 2007) i les gàbies d'exercici (García-Mesa *et al.*, 2011). Aquesta hiperactivitat (Giménez-Llort *et al.*, 2010) condueix cap a una menor fiabilitat d'aquestes variables quantitatives (Gerlai, 2001). Per evitar aquest problema i avaluar la cognició amb una menor influència de l'activitat concomitant o patrons emocionals, alguns autors fan un entrenament previ als animals en la tasca o bé els manipulen prèviament per a que s'atenuï o, fins i tot, es suprimeixin aquests factors d'interferència. Però el nostre propòsit és realitzar un fenotipat tenint en compte tant l'existència de deteriorament cognitiu com la presència de patrons BPSD i, en canvi, en el nostre cas utilitzem aquests procediments per a valorar els efectes d'intervencions no farmacològiques (Baeta-Corral i Giménez-Llort, 2014). Per tant, en aquest treball, l'anàlisi qualitativa va proporcionar informació addicional per avaluar el deteriorament cognitiu basant-se en les estratègies utilitzades pels animals en aquestes tasques de resolució de paradigmes. De la mateixa manera, en estudis previs realitzats en altres models mutants, com el knockout per als ratolins A₁R (Lang *et al.*, 2003), l'anàlisi de les estratègies de navegació va mostrar diferències de genotip que no es reflecteixen a través de mesures senzilles com la latència d'escapament o la distància recorreguda.

D'altra banda, la distinció de les conductes de no cerca (flotació i natació en cercles) de les estratègies dirigides o no a un objectiu va permetre fer una diferenciació més precisa entre els genotips. De manera notòria, els animals NTg van mostrar una alta freqüència de flotació. En aquest sentit, és interessant recordar que, contràriament a les rates, la prova de laberint aquàtic de Morris suposa una condició estressant per als ratolins que sovint la superen mitjançant la flotació,

una conducta que podria estar relacionada amb la manca de motivació, fins i tot, com una mena de desesperança conductual (Porsolt *et al.*, 1977). Com s'ha esmentat anteriorment, malgrat alguns autors defensen que els animals han d'estar habituats a laberint aquàtic i nedar a l'aigua abans d'avaluar qualsevol tasca en aquesta prova, nosaltres suggerim que, de fet, és la condició naïf la que millor reflecteix conductes relacionades amb l'ansietat i l'emotivitat, les quals poden interferir en complexes tasques de resolució de paradigmes cognitius. En el genotip transgènic, la conducta preferent de no cerca va ser la natació en cercles, que podria ser considerada com una conducta estereotipada per fer front a l'estrès. Curiosament, al llarg de la prova es va observar una reducció d'aquesta conducta, fet que suporta aquesta hipòtesi.

La flexibilitat cognitiva va ser estudiada en els ratolins 3xTg-AD i NTg tenint en compte el nombre d'estratègies utilitzades en un mateix assaig. Contràriament, la majoria dels estudis fins ara realitzats, simplifiquen l'anàlisi a l'estratègia predominant de cada assaig (Grootendorst *et al.*, 2001; Lang *et al.*, 2003; Janus, 2004; Brody i Holtzman, 2006; Collison, *et al.*, 2012; Barack *et al.*, 2013). Els criteris qualitius basats en les estratègies dirigides o no a un objectiu, similar a la classificació de les estratègies segons la cerca no espacial o espacial atrofica, també van contribuir a fer una distinció més precisa entre els genotips.

En general, la tasca d'aprenentatge guiat permet controlar possibles factors de confusió sensoriomotors o motivacionals, alhora que serveix per establir el nivell base post-habituació, abans d'iniciar la tasca de localització (Guinello *et al.*, 2009). També és important assenyalar que el primer assaig també implica una condició naïf, útil per mesurar les habilitats cognitives, en contrast amb l'experiència que adquireixen els animals en el laberint a mesura que aconsegueixen les posteriors proves. Tal i com es preveia, quan els animals van entrar en contacte amb l'aigua per primera vegada, sense experiència prèvia o coneixement de la tasca, es va observar una cerca a l'atzar en la major part del 3xTg-AD i animals NTg. L'aprenentatge està influenciat per l'experiència (Donato *et al.*, 2013) i això es podria traduir com el canvi progressiu de la cerca a l'atzar cap a les estratègies dirigides a un objectiu al llarg dels successius assaigs. Per tant, la natació directa es va convertir en l'estratègia més observada, en part pel les pistes dins del laberint que faciliten la localització de la plataforma (Giménez-Llort *et al.*, 2013). Al final de la tasca d'aprenentatge de la localització, el rendiment va ser òptim en tots els animals. Probablement, ja que aquesta tasca no requereix el desenvolupament d'una estratègia de mapatge espacial per

la seva solució (Janus, 2004) tant els ratolins 3xTg-AD com els NTg van ser capaços d'aconseguir el mateix nivell de post-habituació.

Pel que fa a l'aprenentatge de la localització, el canvi de posició de la plataforma augmentà la dificultat de la tasca (Giménez-Llort *et al.*, 2013). En el seu primer assaig, els animals no van aconseguir trobar la plataforma en la posició prèvia durant la tasca d'entrenament guiat. Tot i així, es van trobar diferències de genotip en les estratègies utilitzades per trobar la nova ubicació de la plataforma. En els assaigs posteriors, la conducta dels ratolins 3xTg-AD es caracteritzà per l'ús de les estratègies 'mixtes' (diverses estratègies dutes a terme en un sol assaig) i una alta incidència de les estratègies no dirigides a un objectiu. En canvi, la persistència de cerca de la plataforma en la posició durant l'entrenament guiat i la necessitat de corregir l'estratègia utilitzada per trobar la nova ubicació de la plataforma reflecteixen una pobra flexibilitat cognitiva en els ratolins 3xTg-AD.

En l'assaig de memòria final, l'últim paradigma d'aquest disseny experimental, tots els animals van nedar directament cap a la posició de la plataforma durant el paradigma de l'aprenentatge de la localització. Un cop no van aconseguir trobar-la allà, es van trobar diferències de genotip en l'exhibició de les estratègies de cerca utilitzades durant la resta de la prova. Els ratolins 3xTg-AD van persistir en la recerca de la plataforma usant la mateixa estratègia, mentre que els ratolins NTg van optar per combinar estratègies (Cuthbert *et al.*, 2007).

6.4 Conclusions

Les conclusions de l'Estudi II. Fase 1. per a la *Caracterització de les estratègies de navegació en el laberint aquàtic de Morris en ratolins 3xTg-AD i NTg*, als 13 mesos d'edat, van ser les següents:

1. Els animals 3xTg-AD van mostrar un patró d'hiperactivitat persistent en el laberint aquàtic de Morris que estaria d'acord amb el seu perfil BPSD.
2. Les estratègies de cerca de la plataforma dels NTg impliquen l'ús d'una sola estratègia (única) i dirigida.
3. La pitjor funció cognitiva dels 3xTg-AD es va mostrar amb l'ús d'estratègies de cerca no dirigides.
4. L'alta proporció d'estratègies mixtes utilitzada pels 3xTg-AD també posa en evidència els seus dèficits.
5. Els assaigs que impliquen situacions noves (naïf) o amb dificultat són les més adients per mostrar els dèficits.

Estudi II

Fase 2

7. Estudi II. Fase 2. Efectes conductuals a llarg termini del tractament crònic amb cafeïna en ratolins 3xTg-AD i NTg

Tot i que el consum de cafeïna està sent valorat com a possible estratègia terapèutica per a millorar els aspectes cognitius de l'AD, el possible impacte de la seva acció farmacològica ansiogènica paral·lela està poc estudiada. En tant que aquesta demència s'associa, també, a la presència de símptomes neuropsiquiàtrics com l'ansietat, l'agitació, els canvis circadians, etc. hem considerat important avaluar a nivell translacional els efectes del consum crònic de cafeïna sobre aquests perfils. En aquest sentit, els ratolins 3xTg-AD resulten valuosos en tant que aquest model mostra un perfil tipus BPSD molt clar. Així, l'aproximació experimental valora els efectes conductuals a llarg termini (als 13 mesos d'edat) d'un tractament crònic oral amb cafeïna iniciat en mascles adults a 6 mesos. En els ratolins 3xTg-AD, aquestes edats es corresponen amb estadis avançats i inicials de la malaltia, respectivament. La bateria de tests avalua els efectes del tractament en el pes, les funcions sensoriomotores, l'activitat exploratòria, l'emocionalitat i conductes relacionades amb l'ansietat, el ritme circadià i l'aprenentatge i memòria.

7.1 Disseny experimental

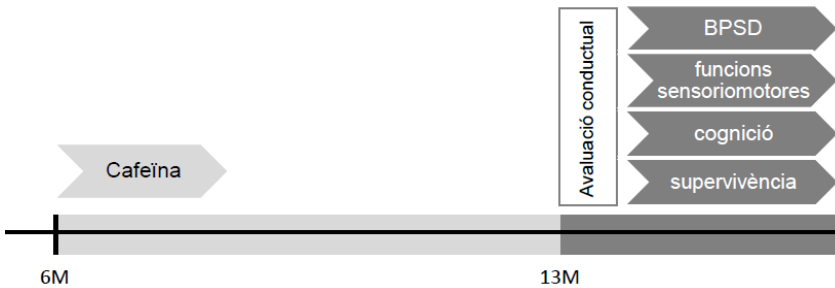


Figura C. Disseny experimental de l'Estudi II. Fase 2.

Els 38 subjectes experimentals provingueren de 15 ventrades, amb 6-8 cries de mitjana. Els mascles de les ventrades van ser distribuïts a l'atzar en els 2 grups experimentals segons el genotip: animals vehicle (7 ventrades) i tractats (8 ventrades). Per tant, el disseny experimental final va consistir en els següents grups experimentals: NTg+veh, NTg+caff, 3xTg-AD+veh i 3xTg-AD+caff ($n=8-10$, en cada grup experimental).

La bateria de proves conductuals es va realitzar als 13 mesos d'edat i va consistir en el test de les cantonades seguit del test del camp obert (Dia 1), el test de la taula de forats (Dia 2), el test de la caixa fosca/clara el test (Dia 3), el test del laberint elevat en creu (Dia 4), el test del laberint en T (Dia 5), el test d'enterrament de marbres (Dia 6), els tests sensoriomotors (Dia 7), el test de l'activitat motora circadiana de 24h (Dies 8-15) i el laberint aquàtic de Morris (Dies 16-21). Al final de l'experiment es va valorar la taxa de supervivència i els pesos corporal i de la melsa.

7.2 Resultats

Test de les cantonades

En aquesta prova es van trobar efectes de genotip i de tractament. L'activitat locomotora horitzontal mesurada com el nombre de cantonades visitades va ser menor en els ratolins 3xTg-AD [G, $F(1,30)=4,760$; $p < 0,05$], en comparació amb els animals NTg. D'altra banda, el nombre de rearings, variable que representa l'activitat vertical, va ser influenciat per la cafeïna, on els animals tractats van trigar més temps a realitzar un primer rearing [T, $F(1,30)=4,676$; $p < 0,05$] i van mostrar una reducció en el nombre total d'aquesta conducta [T, $F(1,30)=4,571$; $p < 0,05$] (Fig.6).

Efectes del tractament crònic de cafeïna en el test de les cantonades

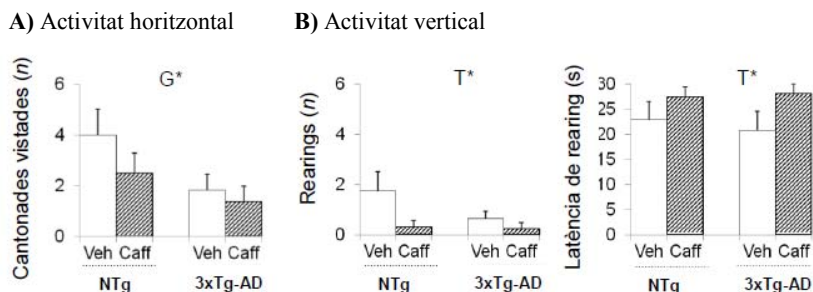


Figura 6. Efectes del tractament crònic de cafeïna en ratolins 3xTg-AD i NTg als 13 mesos d'edat en el test de les cantonades. Activitats horitzontal (A) i vertical (B). Les dades s'expressen per mitja \pm SEM. Veh, vehicle; Caff, cafeïna. ANOVA 2x2: G, efecte genotip; T, efecte tractament; * $p < 0,05$.

Test del camp obert

Des de l'inici de la prova, es van trobar diferències dependents de genotip en la tigmotaxis ja que els animals 3xTg-AD van passar més temps en el centre de l'aparell [G, $t(1,14) = -2,785$; $p < 0,05$] retardant l'arribada a la perifèria [G, $F(1,30) = 4,366$; $p < 0,05$]. La cafeïna va augmentar el temps de permanència al centre en els animals NTg tractats (NTg+caff) mentre que el va reduir en el grup 3xTg-AD [GxT, $F(1,30) = 4,936$; $p < 0,05$]. Un cop a la perifèria, la conducta d'empolainament es va retardar en els ratolins NTg+caff en comparació al seu grup control [T, $F(1,30) = 7,158$; $p < 0,05$ i GxT, $F(1,30) = 8,194$; $p < 0,01$] (Taula 4).

Esdeveniments conductuals	NTg-Veh (n=8)	NTg-Caff (n=8)	Tg-Veh (n=8)	Tg-Caff (n=10)	Estad.
Conducta de petrificació (s)	9.00 ± 2.21	36.50 ± 22.6	58.33 ± 25.8	32.13 ± 10.11	n.s
Aixecaments estereotipats (latència, s)	300 ± 0.00	252.50 ± 35.91	254.33 ± 34.52	271.38 ± 20.36	n.s
Aixecaments estereotipats (n)	0.00 ± 0.00	0.33 ± 0.30	0.17 ± 0.10	1.25 ± 0.90	n.s
Sortida del centre (latència, s)	11.75 ± 2.51	73.33 ± 32.98	81.17 ± 24.8^g	51.63 ± 10.82	GxT*
Arribada a la perifèria (latència, s)	13.00 ± 2.63	75.50 ± 33.09	92.00 ± 25.95^g	127.75 ± 40.79	G*
Activitat vertical (latència, s)	136.75 ± 36.57	103.50 ± 35.8	149.83 ± 30.34	100.63 ± 29.86	n.s
Empolainament (latència, s)	207.00 ± 22.29	295.83 ± 2.13^{tt}	262.50 ± 18.38	259.50 ± 14.14^g	T*, GxT**
Empolainament (s)	2.25 ± 0.48	1.00 ± 0.50	1.50 ± 0.50	1.75 ± 0.52	n.s
Activitat horitzontal (n)	56.25 ± 10.38	85.17 ± 22.98	35.17 ± 11.17	14.00 ± 4.37^g	G**
Activitat vertical (n)	14.00 ± 2.95	12.33 ± 5.14	4.167 ± 0.95^{gg}	3.00 ± 0.75	G**
Defecacions (n)	2.00 ± 0.20	3.50 ± 0.20^{ttt}	3.67 ± 1.0	2.50 ± 0.62	GxT*
Micció (incidence, %)	50	37.5	62.50	60	n.s

Taula 4. Efectes del tractament crònic de cafeïna sobre les estratègies d'enfrontament a l'estrès, les conductes associades a l'ansietat i a l'emotivitat en ratolins 3xTg-AD (Tg) i NTg als 13 mesos d'edat en el camp obert. Les dades s'expressen per mitja ± SEM. Veh, vehicle; Caff, cafeïna. ANOVA 2x2: G, efecte genotip; T, efecte tractament; GxT, interacció genotip x tractament; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. *Post hoc* de la prova Duncan: ^g $p < 0,05$, ^{gg} $p < 0,01$ vs. el grup NTg corresponent; ^{tt} $p < 0,01$, ^{ttt} $p < 0,001$ vs. el grup no tractat corresponent.

En quant a l'activitat locomotora (Fig.7), els ratolins 3xTg-AD van mostrar un menor nombre de creuaments en comparació amb els animals NTg [G, $F(1,30) = 12,132$; $p < 0,01$]. La cafeïna va exercir un efecte bidireccional augmentant aquesta activitat horitzontal en el genotip NTg mentre que la reduí en els animals 3xTg-AD+caff [GxT, $F(1,30) = 8,994$; $p < 0,01$]. En l'activitat vertical, els ratolins 3xTg-AD

van mostrar un nombre reduït de rearings en comparació amb els ratolins NTg [G, $F(1,30)=10,944$ $p<0,01$].

Efectes del tractament crònic de cafeïna en el camp obert

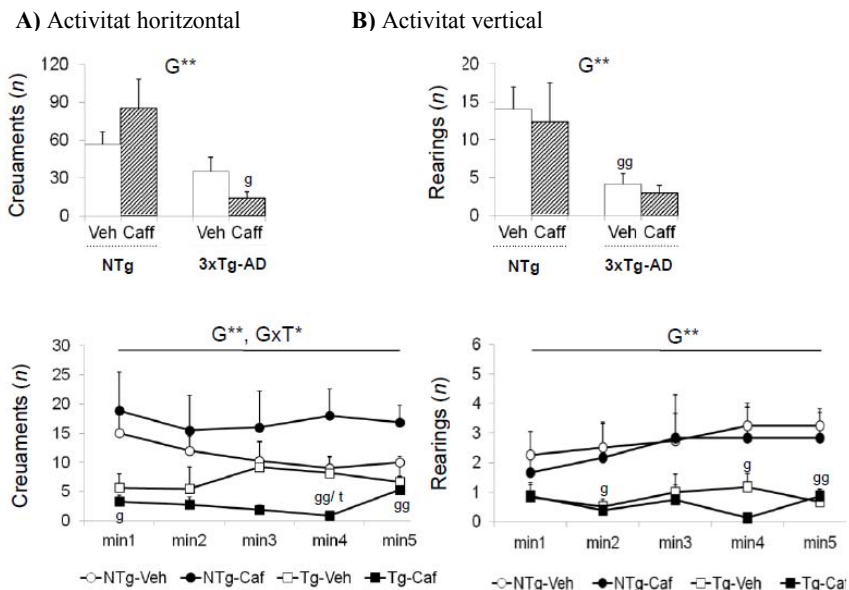


Figura 7. Efectes del tractament crònic de cafeïna en ratolins 3xTg-AD (Tg) i NTg als 13 mesos d'edat en el camp obert. Activitats horitzontal (A) i vertical (B). Les dades s'expressen per mitja \pm SEM. Veh, vehicle; Caff, cafeïna. ANOVA 2x2: G, efecte genotip; GxT, interacció genotip x tractament; * $p<0,05$, ** $p<0,01$. Post hoc de la prova Duncan: ^g $p<0,05$, ^{gg} $p<0,01$ vs. el grup NTg corresponent; ^t $p<0,05$ vs. el grup no tractat corresponent.

Finalment, el nombre de les defecacions mostrarà una interacció 'genotip x tractament' amb un augment en el grup NTg+caff i una disminució en el 3xTg-AD+caff [GxT, $F(1,30)=4,681$; $p<0,05$] (Taula 4).

Test de la taula de forats

Tots els grups van mostrar latències de primer moviment i d'exploració del primer forat similars. La reducció en l'activitat exploratòria vertical dels grups 3xTg-AD va ser la diferència més significativa de tot el test [G, $F(1,30)=13,492$; $p<0,001$]. El tractament va disminuir l'activitat vertical en tots dos genotips [T, $F(1,30)=5,290$; $p<0,05$]. Els grups 3xTg-AD van fer més d'introduccions del cap dins dels forats [G, $F(1,30)=4,750$; $p<0,05$] i el temps total va ser major [G, $F(1,30)=4,818$;

$p < 0,05$]. El 100% dels ratolins dels grups 3xTg-AD van aconseguir arribar al criteri d'explorar els 4 forats [G , $t(1,14) = -3,055$; $p < 0,05$] necessitant menys temps per fer-ho [G , $F(1,30) = 4,893$; $p < 0,05$]. La cafeïna va reduir la incidència d'animals que van arribar al criteri, independentment del genotip, [T , $F(1,30) = 11,904$; $p < 0,01$]. També va augmentar els errors en el genotip 3xTg-AD mentre que en els ratolins NTg+caff el nombre d'errors va disminuir amb el tractament de cafeïna. [$G \times T$, $F(1,30) = 5,652$; $p < 0,05$] (Fig.8).

Efectes del tractament crònic de cafeïna en la taula dels forats

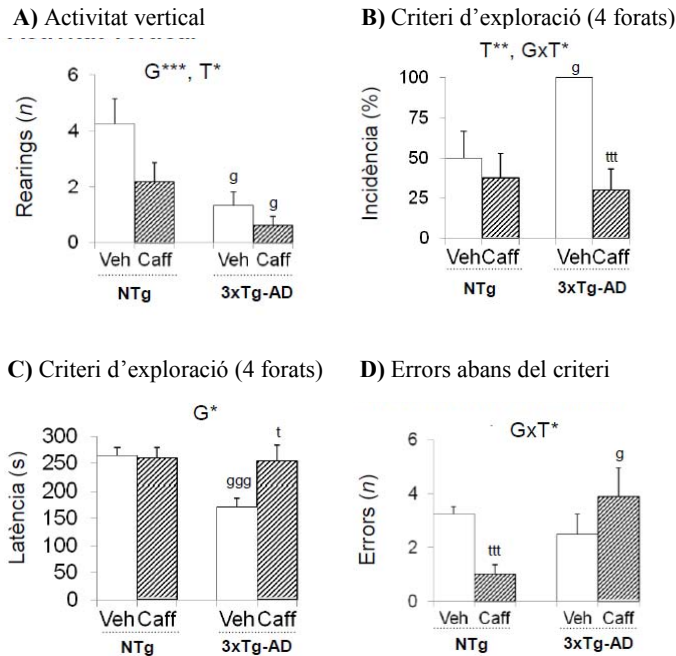


Figura 8. Efectes del tractament crònic de cafeïna en ratolins 3xTg-AD i NTg als 13 mesos d'edat en la taula dels forats. Activitat vertical (A); incidència (B), latència (C) i nombre d'errors (D) d'assolir el criteri d'exploració dels 4 forats. Les dades s'expressen per mitja \pm SEM. Veh, vehicle; Caff, cafeïna. ANOVA 2x2: G, efecte genotip; T, efecte tractament; GxT, interacció genotip x tractament; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Post hoc de la prova Duncan: ^g $p < 0,05$, ^{ggg} $p < 0,001$ vs. el grup NTg corresponent; ^t $p < 0,05$, ^{ttt} $p < 0,001$ vs. el grup no tractat corresponent.

L'empolainament es va avançar en el temps en els animals 3xTg-AD, i va ser més llarg [G , $F(1,30) = 7,649$; $p < 0,01$ i G , $F(1,30) = 7,179$; $p < 0,05$, respectivament]. Finalment, la cafeïna va reduir el nombre de

defecacions [T, $F(1,30)=5,457$; $p<0,05$], especialment en els 3xTg-AD [GxT, $F(1,30)=6,365$; $p<0,05$].

Test de la caixa fosca/clara

L'activitat d'estiraments d'aproximació (Fig.9A) va ser observada només en els grups de ratolins NTg [G, $F(1,30)=17,690$; $p<0,001$] i la cafeïna augmentà la seva latència [T, $F(1,30)=11,842$; $p<0,01$ i GxT, $F(1,30)=11,842$; $p<0,01$]. El nombre de ratolins dels grups 3xTg-AD que van entrar directament a la zona il·luminada (90-100%) va ser superior a la dels grups NTg (50-70%) [Fig.9B; G, $F(1,30)=9,098$; $p<0,01$]. La conducta desinhibida dels grups 3xTg-AD es va reflectir també en una menor latència d'entrada [G, $F(1,30)=4,859$; $p<0,05$], més del doble de creuaments entre els compartiments [G, $t(1,14)= -3,049$; $p<0,01$] i menys temps total en l'àrea il·luminada [G, $F(1,30)=4,158$; $p<0,05$].

Efectes del tractament crònic de cafeïna en la caixa fosca/clara

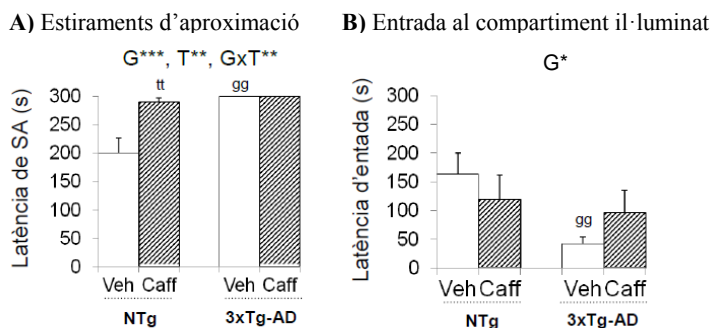


Figura 9. Efectes del tractament crònic de cafeïna en ratolins 3xTg-AD i NTg als 13 mesos d'edat en la caixa fosca/clara. Latència d'estiraments d'aproximació (A) i l'entrada al compartiment il·luminat (B). Les dades s'expressen per mitja \pm SEM. Veh, vehicle; Caff, cafeïna. ANOVA 2x2: G, efecte genotip; T, efecte tractament; GxT, interacció genotip x tractament; * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$. Post hoc de la prova Duncan: gg $p<0,01$ vs. el grup NTg corresponent; tt $p<0,01$, vs. el grup no tractat corresponent.

Test del laberint elevat en creu

La latència d'entrada en els braços oberts (OA) [G, $F(1,30)=20,029$; $p<0,001$] i l'índex d'ansietat TOA/(TOA+TEA) [G, $F(1,30)=43,619$; $p<0,001$] van indicar que els grups de ratolins 3xTg-AD eren més ansiosos. Tots els grups van mostrar un nombre similar d'entrades als diferents braços i a la zona central [totes les $F(1,30)<3,583$; $p>0,068$, n.s.]. En la defecació, es va trobar un efecte genotip i una interacció

‘genotip x tractament’ [G, $F(1,30)=4,536$; $p<0,05$ i $G \times T$, $F(1,30)=6,648$; $p<0,05$, respectivament].

Efectes del tractament crònic de cafeïna en el laberint elevat en creu

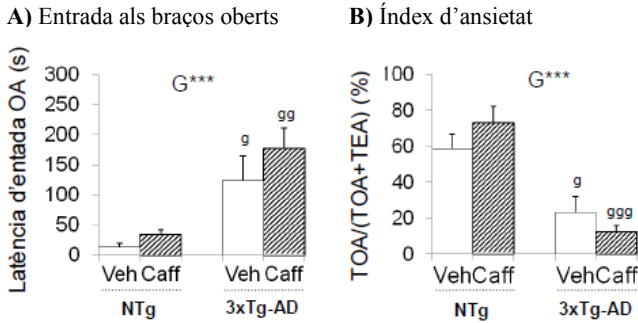


Figura 10. Efectes del tractament crònic de cafeïna en ratolins 3xTg-AD i NTg als 13 mesos d'edat en el laberint elevat en creu. Entrada en els braços oberts (A) i índex d'anxietat (B). Les dades s'expressen per mitja \pm SEM. Veh, vehicle; Caff, cafeïna. ANOVA 2x2: G, efecte genotip; *** $p<0,001$. *Post hoc* de la prova Duncan: $^g p<0,05$, $^{gg} p<0,01$, $^{ggg} p<0,001$ vs. el grup NTg corresponent.

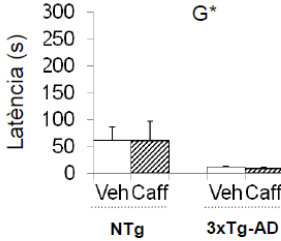
Test del laberint en T

En la prova d'elecció forçada, els grups de ratolins 3xTg-AD van necessitar menys temps per arribar al punt d'intersecció del laberint [G, $F(1,30)=5,729$; $p<0,05$] i per assolir el criteri d'exploració dels 20s [G, $F(1,30)=56,375$; $p<0,05$]. En la prova de memòria, el nombre d'errors comesos abans de triar el braç prèviament tancat va ser inferior en el genotip 3xTg-AD [G, $F(1,30)=6,111$; $p<0,05$]. No obstant, els animals 3xTg-AD tractats van mostrar una menor eficiència per explorar els dos braços, ja que van necessitar més temps per aconseguir l'objectiu [$G \times T$, $F(1,30)=4,188$; $p<0,05$] (Fig. 11).

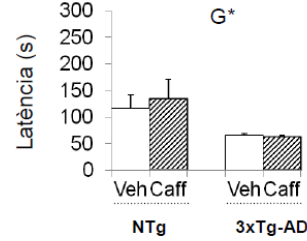
Efectes del tractament crònic de cafeïna en el laberint en T

ASSAIG D'ELECCIÓ FORÇADA

A) Intersecció de la T

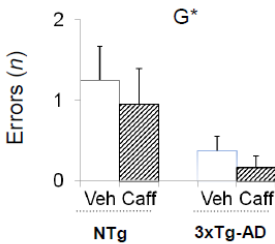


B) Criteri d'aprenentatge



ASSAIG DE MEMÒRIA

C) Errors previs a l'elecció del nou braç accessible



D) Exploració dels 2 braços curts

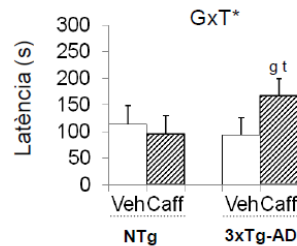


Figura 11. Efectes del tractament crònic de cafeïna en ratolins 3xTg-AD i NTg als 13 mesos d'edat en el laberint en T. Latències d'arribada a la intersecció de la T (A) i del criteri d'aprenentatge (B) en l'assaig d'elecció forçada. Errors (C) i latència d'exploració (D) en l'assaig de memòria. Les dades s'expressen per mitja \pm SEM. Veh, vehicle; Caff, cafeïna. ANOVA 2x2: G, efecte de genotip; GxT, interacció genotip x tractament; * $p < 0,05$. *Post hoc* de la prova Duncan: ^g $p < 0,05$ vs. el grup NTg corresponent; ^t $p < 0,05$ vs. el grup no tractat corresponent.

Test d'enterrament de marbres

Els ratolins 3xTg-AD van enterrar un major nombre de peces [G, $F(1,30)=20,802$; $p < 0,001$], mentre que els animals NTg les van deixar intactes [G, $F(1,30)=8,660$; $p < 0,01$]. La cafeïna va disminuir el nombre de peces enterrades en el genotip 3xTg-AD [GxT, $F(1,30)=5,565$; $p < 0,05$] (Fig.12).

Efectes del tractament crònic de cafeïna en el test d'enterrament de marbres

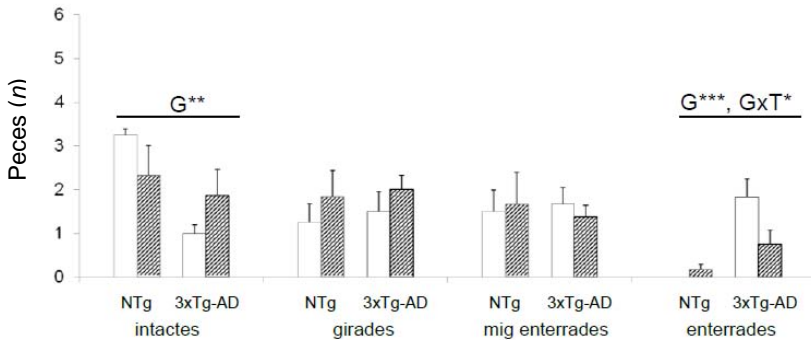


Figura 12. Efectes del tractament crònic de cafeïna en ratolins 3xTg-AD i NTg als 13 mesos d'edat en el test d'enterrament dels marbres. Les dades s'expressen per mitja ± SEM. Veh, vehicle; Caff, cafeïna. ANOVA 2x2: G, efecte genotip; T, efecte tractament; GxT, interacció genotip x tractament; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Pes corporal i funcions sensoriomotores

En iniciar el tractament, els ratolins 3xTg-AD de 6 mesos d'edat tenien sobrepès (+20,26%) [t(1,32)=5,603, $p < 0,001$]. L'efecte de genotip es va mantenir fins al final del tractament (+20,09%) [G, F(1,30)=68,826; $p < 0,001$]. La interacció 'genotip x tractament' [GxT, F(1,30)=7,383; $p < 0,05$] indicà una reducció de pes induïda per la cafeïna en els 3xTg-AD [la prova de Duncan, $p < 0,05$ vs. 3xTg-AD+veh] però no va ser capaç de corregir l'excés de pes respecte el seu control [la prova de Duncan, $p < 0,05$ vs. NTg+caff].

En les proves sensoriomotores, no es van trobar dèficits en els reflexos visuals avaluats, on tots els animals van obtenir la puntuació màxima. En la prova de barra de fusta, la majoria dels animals van petrificar durant els 20s sense cap tipus de desplaçament, fet que explica els valors elevats de la latència de caiguda. Tot i això, els ratolins 3xTg-AD van romandre més temps sobre la barra que els animals NTg [G, F(1,30)=12,037; $p < 0,01$]. La cafeïna aconseguí augmentar la latència de caiguda en el genotip NTg [T, F(1,30)=4,841; $p < 0,05$]. Quan la complexitat de la tasca es va incrementar (prova de la barra de metall) tots els grups van mostrar un pitjor equilibri, però no hi va haver diferències entre els grups ni en la latència de caiguda ni en la distància recorreguda. En la prova del penja-robes, l'assaig de 5s va mostrar diferències dependents de genotip en la latència de caiguda [G, F(1,30)=7,879; $p < 0,01$]. Aquest efecte va ser confirmat en l'assaig de 60s [G, F(1,30)=6,561; $p < 0,05$] (Fig.13).

Efectes del tractament crònic de cafeïna en el pes corporal i en les proves sensoriomotores

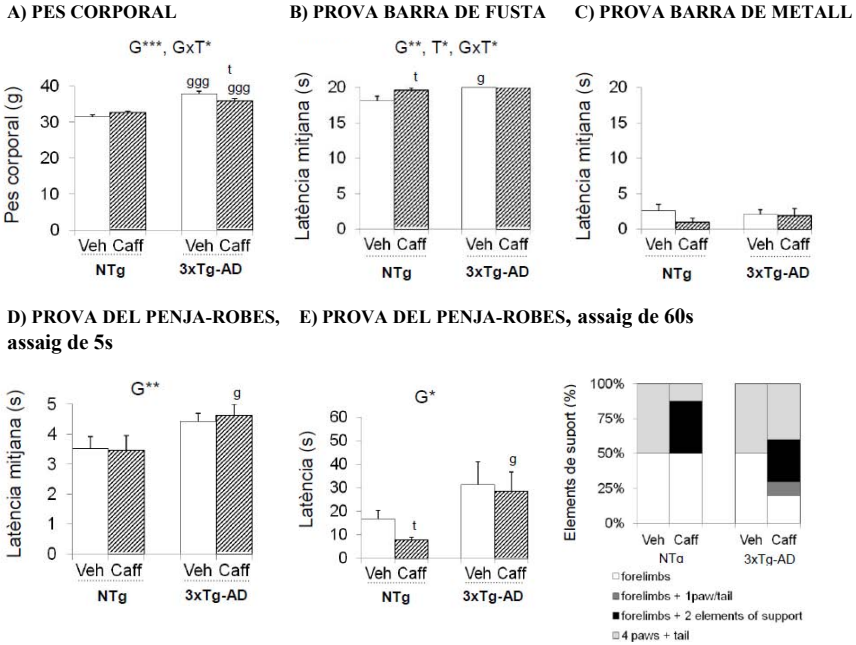


Figura 13. Efectes del tractament crònic de cafeïna en ratolins 3xTg-AD i NTg als 13 mesos d'edat en el pes corporal i les proves sensoriomotores. Les dades s'expressen per mitja \pm SEM. Veh, vehicle; Caff, cafeïna. ANOVA 2x2: G, efecte de genotip; T, efecte de tractament; GxT, interacció genotip x tractament; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. *Post hoc* de la prova Duncan: ^g $p < 0,05$, ^{ggg} $p < 0,001$ vs. el grup NTg corresponent; ^t $p < 0,05$ vs. el grup no tractat corresponent.

Test de l'activitat motora circadiana

L'avaluació dels animals en l'actimetria al llarg d'un cicle de 23h va mostrar el curs temporal circadià [t, $F(23,690)=29,732$; $p < 0,001$] que va diferir segons el genotip [txG, $F(23,690)=4,570$; $p < 0,001$], el tractament [txT, $F(23,690)=5,360$; $p < 0,001$] i amb la interacció d'aquests factors [txGxT, $F(23,690)=2,858$; $p < 0,001$] (Fig14.A). Durant la primera hora d'habitució també es van trobar efectes de temps [t, $F(11,330)=78,341$; $p < 0,001$], de genotip [G, $F(11,330)=9,395$; $p < 0,01$] i interaccions temps x genotip [txG, $F(11,330)=7,984$;

$p < 0,001$], temps x tractament [txT, $F(11,330) = 2,591$; $p < 0,01$] i temps x genotip x tractament [txGxT, $F(11,330) = 4,083$; $p < 0,001$] (Fig.14B). Els animals 3xTg-AD+veh van mostrar una menor activitat circadiana total i en cadascuna de les fases del cicle [t (1,15)= 6,591; $p < 0,01$]. La cafeïna va augmentar l'activitat motora al llarg d'un període de LD de 23h en el genotip 3xTg-AD [Fig.14C; GxT, $F(1,30) = 11,525$; $p < 0,01$], de forma encara més significativa en el període de foscor [Fig14.E; GxT, $F(1,30) = 15,311$; $p < 0,001$].

Efectes del tractament crònic de cafeïna en l'activitat motora circadiana

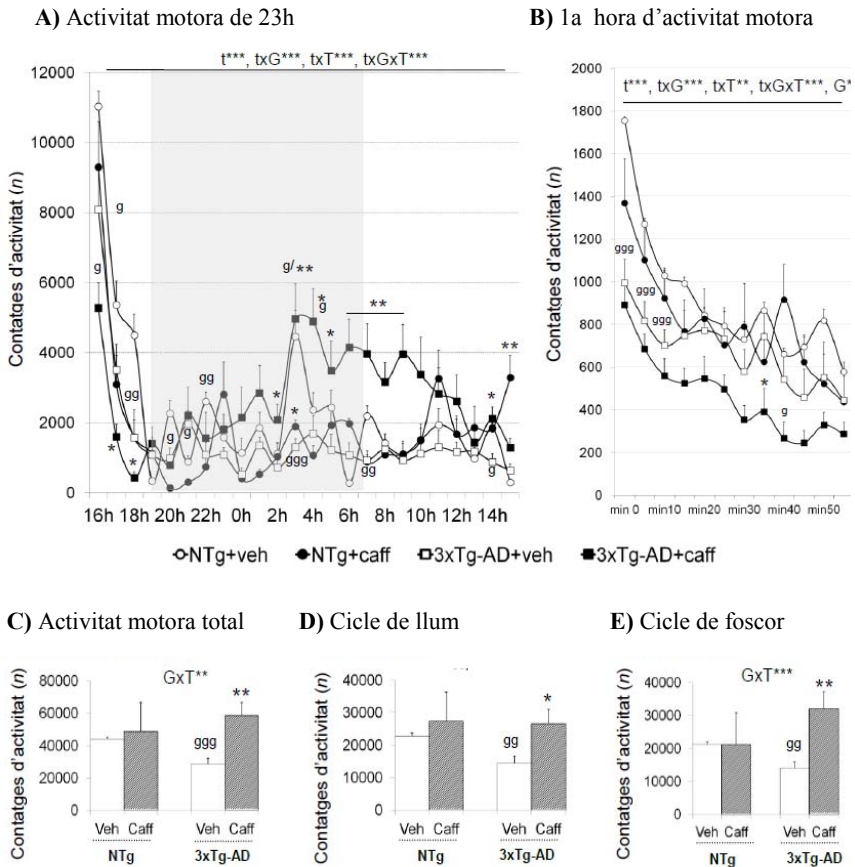


Figura 14. Efectes del tractament crònic de cafeïna en ratolins 3xTg-AD i NTg als 13 mesos d'edat en el test de l'activitat motora circadiana. Les dades s'expressen per mitja \pm SEM. ANOVA 2x2: t, efecte temps; txG, interacció temps x genotip; txT, interacció temps x tractament; txGxT, interacció temps x genotip x tractament; G, efecte genotip; GxT, interacció genotip x tractament * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Post hoc de la prova Duncan: g $p < 0,05$, gg $p < 0,01$, ggg $p < 0,001$ vs. el grup NTg corresponent; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ vs. el grup no tractat corresponent.

Laberint aquàtic de Morris

Les dades dels grups vehicle van ser tractades de forma independent (fase 1) per a caracteritzar, quantitativa i qualitativament, el patrons conductuals mostrats en el MWM i poder discernir trets distintius entre tots dos genotips. Breument, els animals NTg presenten patrons conductuals on hi ha flotació i les seves estratègies de cerca són 'úniques' i 'dirigides'. Per contra, els ratolins 3xTg-AD mostren un patró d'hiperactivitat, que inclou la 'natació en cercles' i l'ús d'estratègies 'mixtes' i 'no dirigides'. En aquest escenari, les variables quantitatives pures (latència i distància) deixen de ser útils per a detectar els dèficits cognitius i és la velocitat de navegació, conjuntament les estratègies, la que delata la presència d'un empitjorament en la funció cognitiva. En aquesta fase 2 de l'estudi, aquestes dades s'analitzen de forma conjunta amb les de la cafeïna i el guany de capacitat estadística ratifica en gran mesura les diferències de genotip trobades en la fase 1 de l'estudi.

En la tasca d'aprenentatge guiat (Fig.15), les anàlisis quantitatives asseveren la reducció de la latència d'escapament en el genotip AD [G, $F(1,30)=29,104$; $p<0,001$] i mostren un efecte de la cafeïna en tots dos genotips, fent que els grups de ratolins tractats necessitessin més temps [T, $F(1,30)=30,891$; $p<0,001$] i recorreguessin una major distància [T, $F(1,30)=28,171$; $p<0,001$] per trobar la plataforma visible en comparació amb els grups no tractats. La diferència de genotip continuà sense aparèixer quan s'analitzà la distància recorreguda [G, $F(1,30)=0,797$; $p=0,067$, *n.s.*] el què implica que els grups 3xTg-AD van mostrar una major velocitat de natació [G, $F(1,90)=21,239$; $p<0,001$]. La cafeïna va augmentar la velocitat en tots dos grups [T, $F(1,30)=5,394$; $p<0,05$].

També, en la tasca de localització, el tractament de cafeïna va augmentar les latències en tots dos genotips [T, $F(1,30)=11,449$; $p<0,01$] i les distàncies recorregudes [T, $F(1,30)=15,566$; $p<0,001$]. La velocitat va ser l'única variable quantitativa que es va mantenir de forma constant al llarg de la prova i, de forma consistent, mostrà la diferència de genotip [G, $F(1,30)=29,593$; $p<0,001$]. La cafeïna va modificar la velocitat de navegació de forma contrària en un i altre genotip, augmentant-la en el NTg i disminuint-la en el 3xTg-AD [GxT, $F(1,30)=9,540$; $p<0,05$]. Aquest efecte en la velocitat és el que fa que la latència reflecteixi les diferències de genotip [G, $F(1,30)=6,920$; $p<0,05$] mentre que la distància continua sense fer-ho. L'anàlisi 'assaig per assaig' va indicar que al llarg de la prova els factor temps, genotip i tractament mostren amb freqüència interaccions mútues [Fig.15B, D i

F; RMA, $F(3,90) > 2,984$; $p < 0,05$]. D'entre totes les diferències detectades, resulta interessant assenyalar que els efectes de la cafeïna es troben tant en assaigs de memòria a llarg termini (T1) com a curt termini (T3 i T4). El nivell d'adquisició assolit al final de la tasca de localització (distància, PT4 i PT4.T4) va ser similar en tots els grups [G i T, $F(1,30) < 1,631$; $p > 0,05$ *n.s.*].

En l'assaig de memòria final (Fig.16), tots els grups experimentals van mostrar la mateixa capacitat de discriminació del quadrant on havia estat la plataforma [totes les ANOVA, $F(3,28) > 25,522$ $p < 0,001$] encara que el grup NTg+caff, ho va fer amb un ordre o dos de magnitud més baix [ANOVA, $F(3,28) > 3,667$ $p < 0,05$].

Efectes del tractament crònic de cafeïna en les tasques d'aprenentatge guiat i de localització

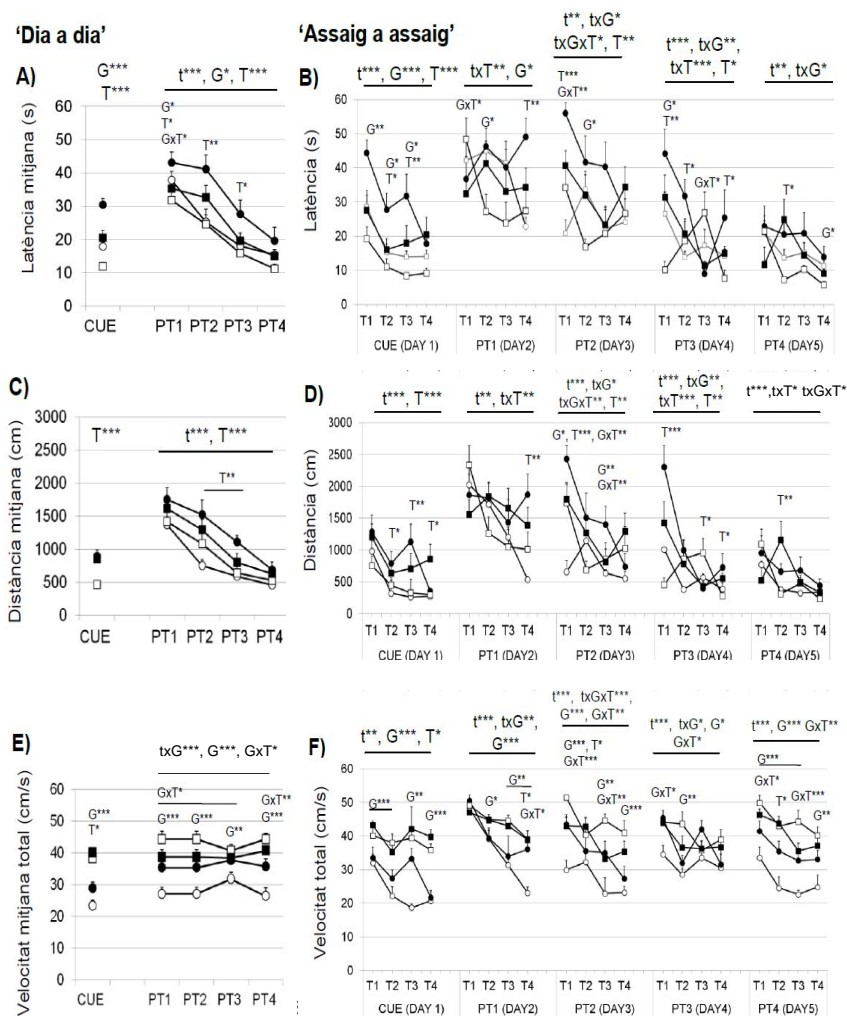


Figura 15. Anàlisi quantitatives de les tasques d'aprenentatge guiat i de localització avaluades en la prova del MWM en ratolins 3xTg-AD i NTg als 13 mesos d'edat. La figura mostra les anàlisi 'dia a dia' (esquerra) i 'assaig per assaig' (dreta). Les dades s'expressen com a mitjana \pm SEM. Veh, vehicle; Caff, cafeïna. ANOVA 2x2: G, efecte genotip; T, efecte tractament; t, efecte temps; GxT, interacció 'genotip x tractament'; txG, interacció temps x genotip; txT, interacció temps x tractament; txGxT, interacció temps x genotip x tractament; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Efectes del tractament crònic de cafeïna en l'assaig de memòria final

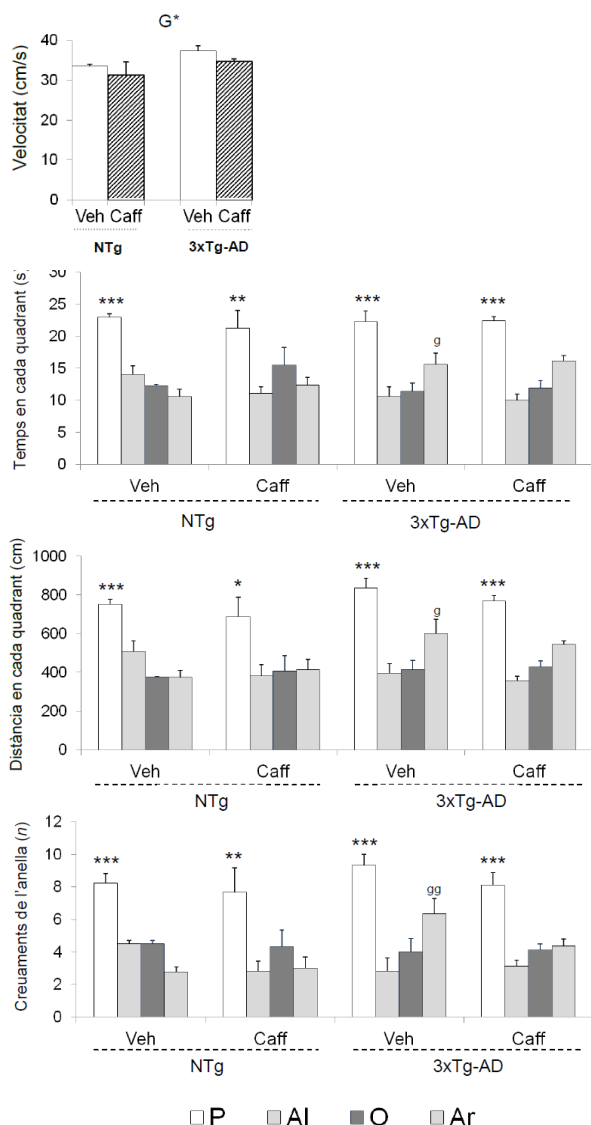


Figura 16. Anàlisi quantitatives en l'assaig de memòria final en el MWM en ratolins 3xTg-AD i NTg als 13 mesos d'edat. Les dades s'expressen com a mitjana \pm SEM del temps, distància i creuaments de l'anella en els quadrants de la plataforma (P), adjacent esquerre (AI), oposat (O) i adjacent dret (Ar). Velocitat de navegació en aquesta prova. ANOVA 2x2: G, efecte genotip; * $p < 0,05$. Prova de *t*-Student: ^g $p < 0,05$, ^{gg} $p < 0,01$ vs. el grup NTg corresponent. ANOVA, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ P vs. tots els altres quadrants.

Les característiques qualitatives de les estratègies de natació analitzades de forma exhaustiva en la fase 1 d'aquest estudi van permetre analitzar els efectes de la cafeïna (Fig.17) centrant-nos en les característiques distintives dels dos genotips: la presència de flotació i l'ús d'estratègies 'úniques' i 'dirigides' per part dels animals NTg, en contraposició a la 'natació en cercles' i l'ús d'estratègies 'mixtes' i 'no dirigides' en un patró hiperactiu dels 3xTg-AD. La cafeïna va modificar aquests patrons d'estratègies, igualant les diferències entre els genotips. Així, en el grup NTg+caff les estratègies van ser 'mixtes' i 'no dirigides' mentre que el grup 3xTg-AD+caff les mostrà 'úniques' i 'dirigides'.

A la tasca d'aprenentatge guiat, la cafeïna va reduir la incidència de flotació en tots dos genotips [T, F(1,30)=7,660; $p < 0,01$] mentre que va augmentar la incidència de 'tigmotaxis' [test exacte de Fisher; $p < 0,05$].

En l'assaig de memòria final, tots els animals vehicle (100%) va nedar 'directament' a l'àrea on es trobava la plataforma oculta, mentre que gairebé el 50% dels animals 3xTg-AD+caff van utilitzar l'estratègia de 'natació a l'atzar'. Al no trobar la plataforma, els ratolins NTg+veh van alternar diferents tipus estratègies mentre que els animals 3xTg-AD+veh van mostrar persistència en la conducta. La cafeïna va fer que en tots dos genotips, els animals mostressin una gran varietat d'estratègies.

Efectes del tractament crònic de cafeïna en les conductes de no cerca i estratègies de cerca

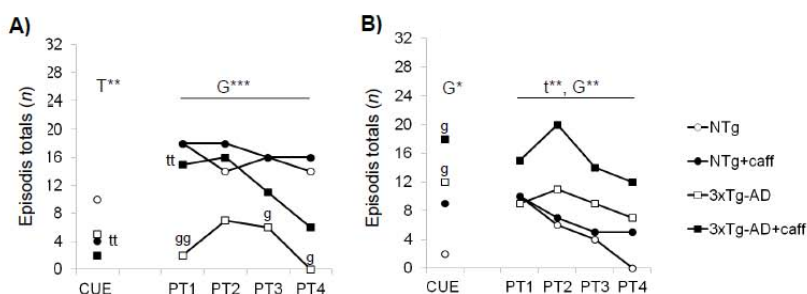


Figura 17. Continua a la pàgina següent.

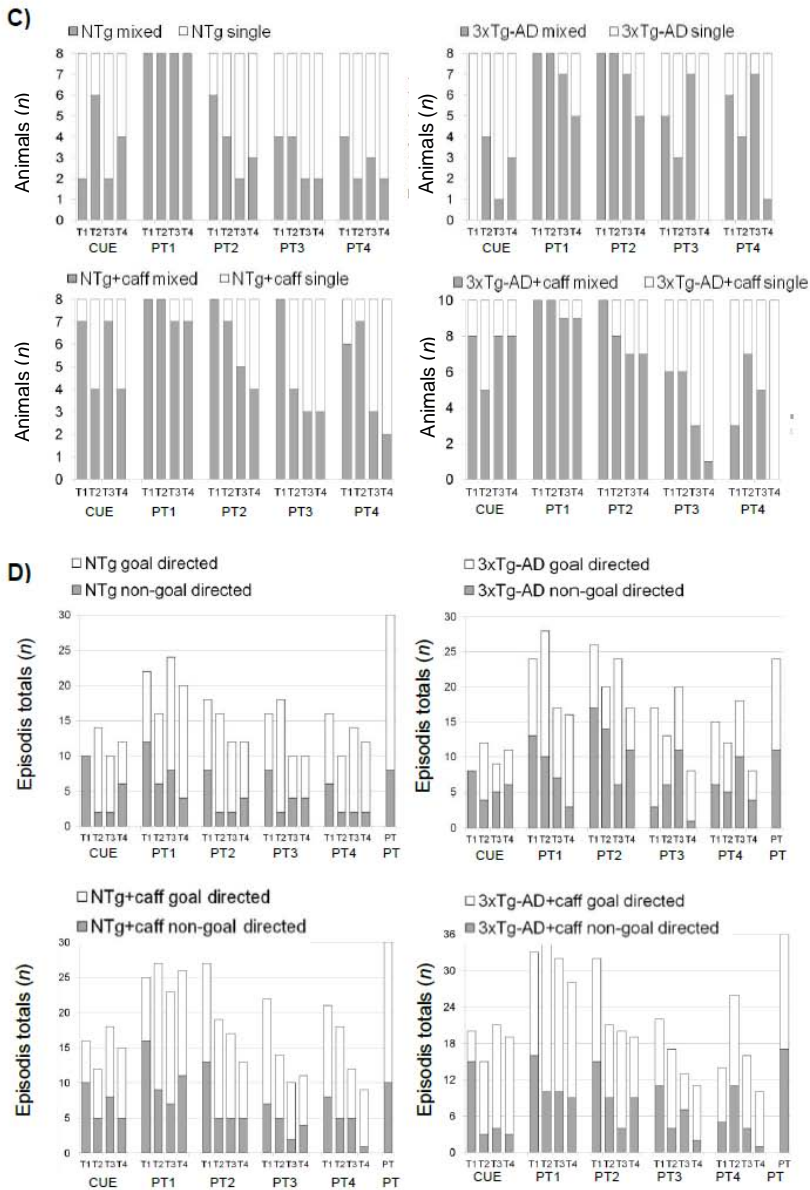


Figura 17. Anàlisi qualitatives de les conductes de no cerca i estratègies de cerca avaluades 'assaig per assaig' en els paradigmes de la prova del MWM en ratolins 3xTg-AD i NTg als 13 mesos d'edat tractats vs. no tractats. La figura representa la conducta de flotació (A), la natació en cercles (B), ús d'estratègies úniques vs. mixtes (C) i estratègies dirigides vs. les no dirigides a un objectiu (D). Les dades s'expressen pe nombre d'animals o d'episodis totals (n). RMA: t, efecte temps; G, efecte genotip; T, efecte tractament; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. *Post hoc* de la prova Duncan: [§] $p < 0,05$, ^{§§} $p < 0,01$, vs. el grup NTg corresponent; [¶] $p < 0,01$ vs. el grup no tractat corresponent.

Supervivència i pes de la melsa

Tots els ratolins NTg+veh van sobreviure fins l'edat de 13 mesos mentre que la taxa de supervivència en els animals 3xTg-AD+veh i el grup NTg+caff de la mateixa edat va disminuir al 80%. Tot i això les diferències no resulten significatives quan s'analitzen estadísticament.

El pes de la melsa es va incrementar en els ratolins 3xTg-AD [G, $F(1,30)=6,549$; $p<0,05$]. En els grups tractats, va observar una tendència de la cafeïna per disminuir el pes de la melsa [T, $F(1,30)=2,721$; $p=0,109$, *n.s.*]. En els ratolins 3xTg-AD + caff, aquesta reducció va ser suficient en els ratolins com per restaurar el pes normal de la melsa [G, $t(1,16)= -1,145$; $p=0,269$ *n.s.* vs. el grup control NTg+veh].

Efectes del tractament crònic de cafeïna en el pes de la melsa

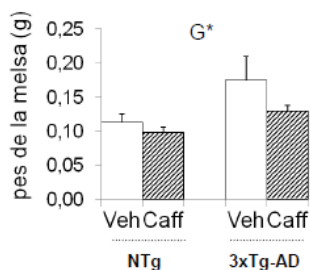


Figura 18. Efectes del tractament crònic de cafeïna en ratolins 3xTg-AD i NTg als 13 mesos d'edat en el pes de la melsa. Les dades s'expressen per mitja \pm SEM. ANOVA 2x2: G, efecte genotip * $p<0,05$.

7.3 Discussió

El present estudi valora els efectes a llarg termini (als 13 mesos d'edat) d'un tractament crònic amb cafeïna iniciat als 6 mesos en mascles adults NTg i 3xTg-AD. Els resultats van demostrar efectes significatius de la cafeïna en la major part de les variables estudiades, principalment aquelles relacionades amb l'ansietat, la neofòbia, l'emotivitat i la flexibilitat cognitiva. La cafeïna va incrementar la neofòbia i altres conductes del perfil ansiós, que en el cas del model 3xTg-AD es va traduir en un agreujament del seu patró BPSD. Els grups tractats amb cafeïna no van millorar la seva memòria a llarg termini fins que no van completar el paradigma conductual i, la memòria a curt termini, en tot cas, es va veure desafavorida. És només en el segon interval de temps de l'assaig de memòria final, on el grup 3xTg-AD tractat amb cafeïna

va ser capaç d'utilitzar estratègies de cerca equivalents a les dels dos grups NTg. A més, els efectes del tractament crònic, en alguns casos van ser de tipus selectiu. D'una banda, en el genotip NTg, la cafeïna va modular altres conductes relacionades amb l'ansietat que corroboren l'increment del perfil ansiós en aquests animals. En canvi, en el genotip 3xTg-AD, els efectes selectius la cafeïna s'observen en l'increment de l'activitat motora circadiana i la reducció del pes corporal i el de la melsa, indicadors de l'estat funcional general. La cafeïna també va exercir efectes de forma bidireccional: estimulants l'activitat motora en els NTg en el OF però reduint-la en els 3xTg-AD; incrementant l'emotivitat dels NTg i disminuint la dels 3xTg-AD en l'OF, HB i EPM; i finalment, modificant les seves estratègies de navegació en el procés d'aprenentatge del MWM, fent-les més similars.

Els efectes ansiogènics induïts per la cafeïna es van traduir, de forma general, en un augment de la neofòbia i el perfil ansiós. En el genotip NTg, la reducció de la conducta exploratòria en el CT, l'augment de la latència per arribar a les àrees protegides (tigmotaxis) en l'OF i el retard en l'aparició de la conducta de valoració del risc en la DLB manifesten aquests efectes ansiogènics. L'augment de les defecacions observat en els animals NTg+caff suggereix un augment de l'emotivitat induïda per la cafeïna. Aquests resultats estan d'acord amb els obtinguts en animals tractats amb dosis altes de cafeïna, on s'observa que són més reactius emocionalment, presentant més immobilitat, més defecacions i una major presència de micció que els animals control (Anderson i Hughes, 2008). En els animals 3xTg-AD, l'increment del perfil ansiós induït pel tractament crònic de cafeïna va suposar un agreujament del patró BPSD, on la resposta conductual varià en funció de la capacitat ansiogènica de cada test. En aquest sentit, l'exposició directa a un camp obert i il·luminat com l'OF, provocà una reducció de l'activitat motora, fent que els animals restessin gairebé immòbils. Per contra, en ambients poc ansiogènics com l'actimetria, la resposta ansiosa es va veure reflectida com un increment del patró hiperactiu, característic dels animals 3xTg-AD (Giménez-Llort *et al.*, 2013). En la tasca d'aprenentatge guiat del MWM, aquest increment del patró hiperactiu induït per la cafeïna també s'observà com un augment de la velocitat de navegació comparat amb el grup 3xTg-AD vehicle.

Els efectes estimulants de la cafeïna a nivell motor es van observar en els animals NTg com un increment tant en el nombre de creuaments en l'OF com en la velocitat de natació en les tasques d'aprenentatge del MWM. Tal com era d'esperar (p.ex. Nehlig *et al.*, 1992), aquest efecte estimulador de l'activitat motora horitzontal va anar en decrement de

l'activitat vertical, considerada la variable que millor reflecteix la conducta exploratòria *per se* (Colorado *et al.*, 2006). Per tant, la cafeïna va exercir els seus efectes augmentant la hiperactivitat i reduint la conducta exploratòria vertical.

Pel que fa a les funcions sensoriomotors, en els resultats obtinguts en l'equilibri dels 3xTg-AD no es pot excloure la presència d'un fals positiu, ja que la por innata a les altures va fer que els grups amb més petrificació (genotip 3xTg-AD tractat amb cafeïna) fossin els que es van mantenir més temps sobre la barra. En canvi, en els animals NTg que deambulen per la barra, la cafeïna va millorar l'equilibri però va empitjorar la resistència muscular en aquest genotip. Aquests resultats es van obtenir també en ratolins knockout pel receptor A₁ (Giménez-Llort *et al.*, 2002), una estratègia genètica per a emular els efectes crònics de la cafeïna (Johansson *et al.*, 2001)

El nostre tractament a llarg termini amb una dosi baixa de cafeïna va modificar, encara que no corregir, el sobrepès característic de la colònia espanyola dels 3xTg-AD que està present des dels 6 mesos d'edat (Giménez-Llort *et al.*, 2010). S'ha demostrat que el tractament crònic de cafeïna prevé l'augment de pes en els rosegadors que han estat alimentats amb una dieta rica en greixos (Moy i McNay, 2013). En particular, les estratègies saludables més comunes, que s'estan avaluant en aquesta colònia d'animals, com l'exercici forçat (Giménez-Llort *et al.*, 2010) o l'exercici físic voluntari (García-Mesa *et al.*, 2011; 2012) no aconsegueixen reduir el pes corporal. Els ratolins 3xTg-AD tenen una major contribució relativa de teixit adipós blanc (en anglès *white adipose tissue*, WAT) (García-Mesa *et al.*, 2011; 2012) que s'aconsegueix reduir gràcies a aquestes estratègies. En el present treball, l'augment de l'activitat nocturna que es trobà en els ratolins 3xTg-AD+caff podria explicar la seva pèrdua de pes. A nivell fisiològic, la reducció de la hipermegàlia de la melsa, característica del 3xTg-AD i indicador indirecte de l'empitjorament de l'estat funcional del sistema neuroimmunoendocrí (Giménez-Llort *et al.*, 2008), suggereix que en el grup 3xTg-AD+caff, podria haver-hi una millora en la desregulació d'aquesta xarxa que està començant a ser descrita com a rellevant en l'AD (Giménez-Llort *et al.*, 2014).

Els efectes de la cafeïna avaluats en el MWM van mostrar que, en la prova d'aprenentatge guiat, l'increment de la latència, distància i velocitat que exerceix la cafeïna crònica sobre tots dos genotips de forma indistinta, no es corresponen amb els efectes cognitius esperats, ans al contrari. En la primera experiència en el laberint, els beneficis atribuïts a la cafeïna millorant l'atenció (Griffiths *et al.*, 1990), no va

conferir cap avantatge als animals en aquesta tasca d'aprenentatge que es considera de tipus perceptiu visual. En els següents tres assaigs de memòria a curt termini, els efectes també van ser contraris a l'esperat, augmentant la distància necessària per arribar a la plataforma.

En la prova d'aprenentatge de la localització, l'increment de la velocitat en el grup NTg i la disminució en el 3xTg-AD semblaria els efectes estimulants i depressors de dosis baixes i altes de cafeïna, respectivament (Fredholm *et al.*, 1999). Així, en el grup NTg, la dosi crònica de 0,3mg/Kg va actuar estimulants la velocitat de navegació mentre que en els ratolins 3xTg-AD –que mostren de forma consistent una velocitat més alta que els NTg– la seva reducció induïda per la cafeïna podria ser el resultat d'un efecte farmacològic final depressor. Tot i que sembla que la cafeïna millora la memòria a curt termini perquè ho fa de manera excepcional en un parell d'assaigs, aquesta dada resulta irrellevant en front dels altres nou assaigs en els quals l'efecte significatiu de la cafeïna implica un empitjorament de l'execució. Al final d'aquesta tasca, tots els grups experimentals van arribar al mateix nivell d'adquisició i a l'assaig de memòria final, realitzat 1h 30min després, van mostrar la mateixa capacitat de recordar la posició de la plataforma final, encara que el grup NTg+caff ho va fer amb un ordre o dos de magnitud inferior. Donat que en els primers assaigs de cada dia els valors quantitius entre NTg i 3xTg-AD estaven més distanciat, és probable que un assaig de memòria final a les 24h hagués estat més adequat per observar diferències cognitives utilitzant aquestes variables. En general, els resultats quantitius reflecteixen que, en aquestes condicions experimentals, els resultats cognitius es van veure fortament condicionats per les diferències de genotip en la velocitat de natació o pel perfil hiperactiu que mostra la nostra colònia 3xTg-AD.

L'ambient ansiogènic del MWM pels ratolins, en el nostre plantejament experimental podria quedar reflectit en l'alt nivell de flotació observat en els animals NTg i l'increment sostingut de la velocitat dels 3xTg-AD. Això fa que, en aquesta colònia, el MWM no pugui ser utilitzat de forma absoluta per reproduir els dèficits cognitius que mostren en altres models per a l'AD (p.ex. Arendash *et al.*, 2009). Aquests efectes ansiogènics de la cafeïna poden haver contrarestat els possibles efectes cognitius, tant en les tasques d'aprenentatge i memòria perceptiu visual (prova d'aprenentatge guiat) com espacial (prova d'aprenentatge de la localització). El fet que els 3xTg-AD mostrin una corba d'adquisició fins i tot millor que la dels animals NTg ens recorda els resultat obtinguts en aquesta mateixa colònia d'animals en el test de la por

condicionada (España *et al.*, 2010). En aquell treball, no només el model 3xTg-AD sinó també els models APP_{swe} and APP_{swe/ind} van mostrar una resposta de por contextual condicionada emfatitzada, que era dependent dels seus respectius nivells d'acumulació de β A en l'amígdala basolateral.

El possible emmascarament que la presència de la flotació pot exercir sobre les mesures de les variables de latència i distància també va ser analitzat estadísticament. Els resultats no van variar respecte als que s'il·lustren en aquesta tesi i que inclouen la presència de flotació.

En tots dos genotips, la cafeïna va reduir la incidència de flotació en la tasca d'aprenentatge guiat. Aquesta acció podria ser explicada pels seus efectes augmentant l'atenció en aquesta prova d'aprenentatge i memòria de tipus perceptiu visual. Els seus efectes incrementant la incidència de la 'tigmotaxis', nedant de forma persistent al voltant de la paret de la piscina, serien congruents amb la hiperactivitat locomotora horitzontal induïda per la cafeïna en l'OF.

És en les estratègies (Estudi II. Fase 1) on justament hem trobat trets característics que permeten distingir de forma contrastada els dos genotips: estratègies úniques i dirigides en els animals NTg però mixtes i no dirigides en els 3xTg-AD. La cafeïna va disminuir les diferències de genotip en les proves d'aprenentatge i memòria, perquè va fer que els animals NTg amb tractament mostressin també estratègies de tipus mixtes i no dirigides, i els 3xTg-AD fessin viceversa. Per tant, les conductes que abans estaven ben discriminades, ara van ser més similars.

En l'assaig de memòria final, vam distingir dos intervals: el primer tram de navegació, fins que els animals arriben al lloc on prèviament havia estat la plataforma i l'interval restant en el qual els animals poden buscar-la o no en una nova possible localització. Així com en el primer interval tots els animals, 3xTg-AD i NTg, van nedar de forma directa a la plataforma, el tractament de cafeïna va reduir al 50% aquesta estratègia en el grup 3xTg-AD+caff. En el segon interval d'assaig es podria hipotetitzar que els animals es troben davant d'un problema similar al del primer dia de la prova de localització, amb l'excepció que aquí han assolit ja el procés d'adquisició. És aquí on els 3xTg-AD van mostrar poca flexibilitat cognitiva utilitzant una única estratègia i de forma persistent, el que es podria considerar poc adaptatiu per resoldre aquesta situació. La cafeïna va incrementar la varietat d'estratègies en el grup 3xTg-AD suggerint que millorà els processos d'integració

cognitiva que poden estar intervenint en aquesta resolució del problema.

Pel que fa a les dades de mortalitat en aquest estudi, el nombre d'animals està molt lluny del mínim necessari per a avaluar de forma fiable el grau de supervivència i els efectes de la cafeïna en ella. El que sí que podem dir, és que en el nostre laboratori s'ha descrit un augment de la vulnerabilitat dels mascles 3xTg-AD a nivell neuroimmunoendocrí que podria explicar el 40% de mortalitat a partir dels 12-13 mesos d'edat (Giménez-Llort *et al.*, 2008). Les dades del present estudi estarien d'acord amb aquesta menor supervivència dels ratolins 3xTg-AD. La mortalitat observada en els grup NTg+caff tindria com a paral·lel la corba de supervivència reduïda trobada en els ratolins knockout A₁ (Giménez-Llort *et al.*, 2002).

7.4 Conclusions

Les conclusions de l'Estudi II. Fase 2 dels *Efectes conductuals a llarg termini del tractament crònic amb cafeïna en ratolins 3xTg-AD i NTg* van ser les següents:

1. En la major part de les variables estudiades, la cafeïna va incrementar la neofòbia i altres conductes del perfil ansiós, que en el cas del model 3xTg-AD es va traduir en un agreujament del seu patró BPSD.
2. La cafeïna no va millorar la memòria a llarg termini dels animals fins que no van completar el paradigma conductual i, la memòria a curt termini, en tot cas, es va veure desafavorida.
3. Els efectes cognitius esperats només s'observen en el segon interval de temps de l'assaig de memòria final, on el grup 3xTg-AD tractat amb cafeïna va ser capaç d'utilitzar estratègies de cerca equivalents a les dels dos grups NTg.
4. Els efectes de la cafeïna selectius pels NTg es mostren en la modulació d'altres conductes relacionades amb el perfil emocional i la valoració del risc.
5. En el genotip 3xTg-AD, els efectes selectius la cafeïna s'observen en l'increment de l'activitat motora circadiana i la reducció del pes corporal i el de la melsa, indicadors de l'estat funcional general.
6. La cafeïna va exercir efectes de forma bidireccional: estimulants conductes motores i l'emotivitat en els NTg però reduint-les en els 3xTg-AD. El tractament crònic també modifica les seves estratègies de navegació en el procés d'aprenentatge del MWM, fent-les més similars.

Estudi III

8. Estudi III. Caracterització conductual de l'administració crònica amb D-galactosa en ratolins c57bl/6

Per valorar els efectes conductuals del tractament subcutani crònic amb D-galactosa, un model farmacològic d'envelliment accelerat, es van fer servir animals c57bl/6 adults de 4 mesos. Després dels 56 dies de tractament pautat, la resposta conductual es va analitzar mitjançant una àmplia bateria de tests conductuals amb la que es van valorar els efectes del tractament sobre les funcions sensoriomotors, l'activitat exploratòria, la neofobia, les conductes bizarres, l'ansietat i l'aprenentatge i memòria. La dosi resposta 0-50-100 va establir-se en base a la dosi de 100 mg/kg, *s.c.*, 56 dies, que és la que la literatura descriu com a inductora d'un envelliment accelerat.

8.1 Disseny experimental

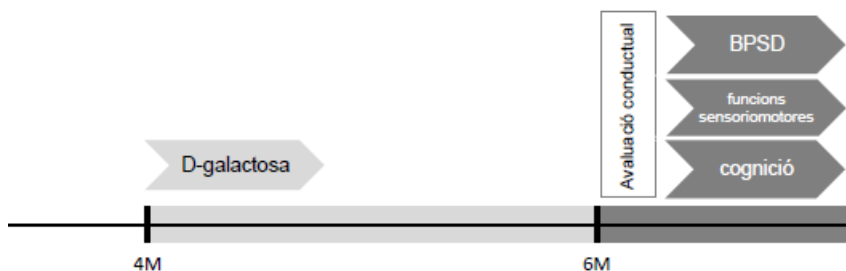


Figura D. Disseny experimental de l'Estudi III

Els 58 subjectes experimentals vingueren de 24 ventrades, amb 6-8 cries de mitjana. Les ventrades van ser distribuïdes a l'atzar en els 3 grups experimentals: animals salí (8 ventrades), 50mg/Kg (8 ventrades) i 100mg/Kg (8 ventrades), (amb una *n* final de=9-10 animals de cada gènere per grup experimental).

La bateria de proves conductuals es va realitzar als 6 mesos d'edat i va consistir en el test de les cantonades seguit del test del camp obert (Dia 1), el test de la caixa fosca/clara (Dia 4), els tests sensoriomotors (Dia 5), el test del laberint en T (Dia 6 i 7), el rotarod (Dia 8) i el laberint aquàtic de Morris (Dies 9-13).

8.2 Resultats

Les figures 19-25 mostren el fenotip conductual de la soca c57bl/6 exhibit als 6 mesos d'edat en les diferents proves estudiades i els efectes del tractament amb D-galactosa en aquests comportaments.

Test de les cantonades

Tots els grups de mascles, independentment de la dosi, van mostrar la mateixa activitat horitzontal i vertical. Les femelles controls van realitzar més visites a les cantonades que els seus respectiu mascles. Aquestes diferències de gènere [t(1,17)=2,318, $p<0,05$] van desaparèixer en els animals tractats amb D-galactosa (dosi baixa, L i alta, H) ja que el tractament va reduir el nombre de cantonades visitades en el gènere femení de forma dosi dependent [t(1,17)=2,377, $p<0,05$] (Fig.19A). En les femelles, tampoc es van observar diferències en l'activitat vertical, ni entre grups [T,F(2,52)=0,142; $p=0,868$; *n.s.*], ni en comparació a l'altre gènere [S, F(1,52)=1,250, $p=0,269$; *n.s.*]. Els mateixos resultats es van obtenir en la variable de latència del primer rearing.

Efectes del tractament crònic de D-gal en el test de les cantonades

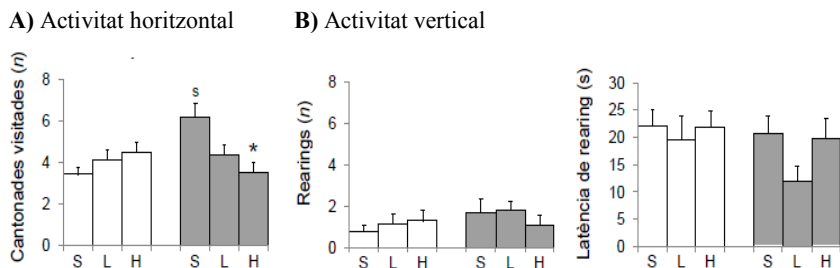


Figura 19. Efectes del tractament crònic de D-galactosa en ratolins mascles i femelles c57bl/6 als 6 mesos d'edat en el test de les cantonades. Activitats horitzontal (A) i vertical (B). Les dades s'expressen per mitjana \pm SEM. Barres obertes: mascles; Barres tancades: femelles. S: salí, L: dosi baixa, 50mg/Kg de D-galactosa; H: dosi alta, 100mg/Kg de D-galactosa. *Post hoc* de la prova Duncan: ^s $p<0,05$ vs. el grup mascle corresponent; * $p<0,05$ vs. el grup salí corresponent.

Test del camp obert

La presència de conductes bizarres va mostrar diferències de gènere en tant que els mascles en varen fer més que les femelles [S, F(1,52)=22,471; $p<0,001$]. A més, la dosi baixa de D-galactosa va

reduir la incidència de la majoria d'aquests moviments bizarres en el gènere femení [SxT, $F(2,52)=6,753$; $p<0,01$]. La conducta d'empolainament es va avançar en les femelles [S, $F(1,52)=11,202$;

ESDEVENIMENTS CONDUCTUALS	M NTq S (n=9)	M NTq 50mg/kg (n=9)	M NTq 100mg/kg (n=10)	F NTq S (n=10)	F NTq 50mg/kg (n=10)	F NTq 100mg/kg (n=10)	Estat.
OPEN FIELD TEST							
Conducta de petrificació (s)	5.56 ± 1.01	4.44 ± 1.12	5 ± 0.75	4.5 ± 0.85	3.5 ± 0.56	4.8 ± 1.08	n.s
Conduetes bizarres (incidència, %)	100	100	100	100	50 ^{sss}	60 ^t	S*** T** SxT**
Conduetes bizarres totals (n/màxim)	22/38	21/38	18/40	18/40	8/40 ^{sss}	15/40	S***
Estiraments estereotípics (incidència, %)	77.78	77.78	40	50	30 ^s	60	n.s
Caminar cap enrere (incidència, %)	55.56	33.33	40	20	10	20	S*
Aixecaments estereotípics (incidència, %)	100	100	100	90	40 ^t	70	S***
Aixecaments estereotípics (n)	8.22 ± 2.28	9.33 ± 2.4	3.9 ± 1.22	8 ± 2.53	2.8 ± 1.35 ^{ss}	4.1 ± 1.88	n.s
Salts (incidència, %)	11.11	22.22	0	20	0	0	n.s
Sortida del centre (latència, s)	22.56 ± 9.03	15 ± 2.96	12.1 ± 2.15	11.2 ± 2.77	8.7 ± 1.85	13.6 ± 2.54	n.s
Arribada a la perifèria (latència, s)	66.33 ± 30	32.67 ± 11.01	51.8 ± 15.31	33.4 ± 7.92	13 ± 2.65 ^t	36.5 ± 8.28	n.s
Activitat vertical (latency, s)	182.2 ± 36.84	101 ± 21.36	105.3 ± 24.26	118.6 ± 31.22	97.9 ± 32.96 ^s	104.8 ± 42.73	n.s
Empolainament (latència, s)	177.6 ± 18.72	150.11 ± 14.03	168.3 ± 12.05	111.7 ± 15.58	118.2 ± 18.31	134.6 ± 16.56	S**
Empolainament (s)	3.67 ± 0.58	5 ± 1.11	2.9 ± 0.31	6.8 ± 1.44	4.5 ± 0.82	4.3 ± 0.47 ^s	n.s
Activitat horitzontal (n)	60.11 ± 12.57	102 ± 16.54	126.4 ± 22.6 ^t	79.8 ± 11.2	100.4 ± 17.28	68.2 ± 11.84 ^s	SxT*
Activitat vertical (n)	8.11 ± 1.61	15.67 ± 2.74 ^t	17.9 ± 4.38	11.9 ± 2.34	8.9 ± 1.24 ^s	8.7 ± 2.54	SxT*
Defecacions (n)	2.33 ± 0.47	2 ± 0.37	2.5 ± 0.34	1.9 ± 0.35	2.5 ± 0.4	2.4 ± 0.4	n.s
Micció (incidència, %)	55.56	22.22	20	50	30	30	n.s

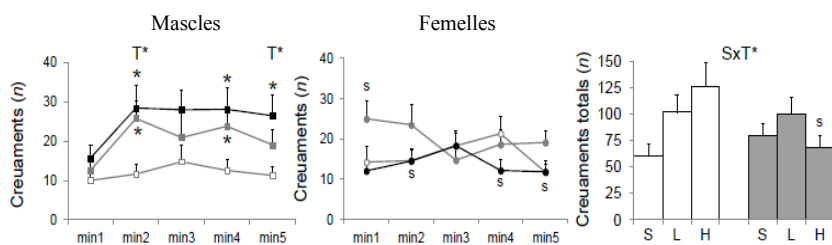
$p<0,01$], independentment del tractament (Taula.5).

Taula 5. Efectes del tractament crònic de D-galactosa en ratolins mascles i femelles c57bl/6 als 6 mesos d'edat en el test del camp obert. Les dades s'expressen per mitjana ± SEM. ANOVA 2x3: S, efecte gènere; T, tractament; SxT: interacció gènere x tractament * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$. *Post hoc* de la prova Duncan: ^s $p<0,05$; ^{ss} $p<0,01$ ^{sss} $p<0,001$ vs. el grup mascle corresponent; ^t $p<0,05$; ^{ttt} $p<0,001$ vs. el grup salí corresponent.

Finalment, la interacció 'gènere x tractament' trobada en els mascles reflectí un augment tant en l'activitat horitzontal [SxT, $F(2,52)=3,216$; $p<0,05$] com en la vertical [SxT, $F(2,52)=3,233$; $p<0,05$] en aquest grup (Fig.20).

Efectes del tractament crònic de D-gal en el camp obert

A) Activitat horitzontal



B) Activitat vertical

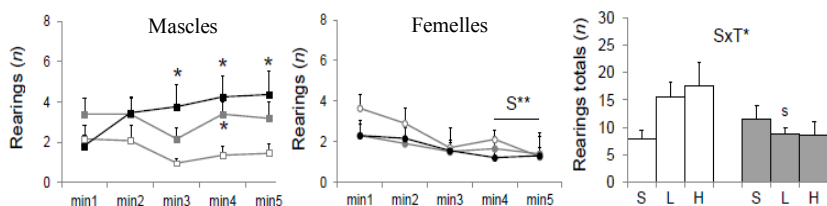


Figura 20. Efectes del tractament crònic de D-galactosa en ratolins mascles i femelles c57bl/6 als 6 mesos d'edat en el test del camp obert. Les dades s'expressen per mitjana \pm SEM. Barres obertes: mascles; Barres tancades: femelles. S: salí, L: dosi baixa, 50mg/Kg de D-galactosa; H: dosi alta, 100mg/Kg de D-galactosa. Símbol blanc: salí, Símbol gris: dosi baixa, Símbol negre: dosi alta. ANOVA 2x3: S, efecte gènere; T, efecte tractament; SxT, interacció gènere x tractament; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. *Post hoc* de la prova Duncan: ^s $p < 0,05$ vs. el grup mascle corresponent; * $p < 0,05$ vs. el grup salí corresponent.

Test de la caixa fosca/clara

Les femelles van ser menys actives que els mascles en el compartiment fosc [S, $F(1,52)=5,962$; $p < 0,05$] i la D-gal va retardar l'execució del primer rearing [T, $F(2,52)=3,257$; $p < 0,05$] (Taula.6). La conducta d'estiraments d'aproximació va ser similar entre tots els grups, així com la latència i el nombre d'entrades al compartiment clar (Fig.21). Tot i així, les femelles van passar menys temps a la zona il·luminada [S, $F(1,52)=6,054$; $p < 0,05$]. No es van observar diferències en les defecacions ni en la micció.

ESDEVENIMENTS CONDUCTUALS	M NTg S (n=9)	M NTg 50mg/kg (n=9)	M NTg 100mg/kg (n=10)	F NTg S (n=10)	F NTg 50mg/kg (n=10)	F NTg 100mg/kg (n=10)	Estad.
TEST DE LA CAIXA FOSCA/CLARA							
COMPARTIMENT FOSC							
Conducta de petrificació (s)	3.44 ± 1.29	3 ± 0.8	3.6 ± 1.38	2.4 ± 0.67	1.4 ± 0.27	1.1 ± 0.1	n.s
Activitat vertical (latència, s)	29.11 ± 8.51	74.11 ± 22.1	44.9 ± 11.42	42.1 ± 10.74	55.5 ± 17.59	24.8 ± 7.15	T*
Activitat vertical (n)	6.44 ± 1.56	6.44 ± 1.63	9.2 ± 2.56	5.1 ± 1.04	3.9 ± 0.97	4.6 ± 0.85	S*
Conducta d'empolainament (latència, s)	164.3 ± 24.93	212.44 ± 30.33	198.7 ± 24.89	148.7 ± 15.39	135.4 ± 21.6^S	106.4 ± 8.37^{SS}	S***
Conducta d'empolainament (s)	3.56 ± 1.02	4.78 ± 2.21	3 ± 0.89	3 ± 0.37	4.5 ± 0.96	5.4 ± 1.59	n.s
Defecacions (n)	2.11 ± 0.45	2 ± 0.73	1.4 ± 0.4	1.9 ± 0.5	1.4 ± 0.34	2 ± 0.37	n.s
Micció (incidència, %)	22.22	11.11	10	10	40	40	n.s
COMPARTIMENT CLAR							
Estriments d'aproximació (latència, s)	21.22 ± 7.89	53.33 ± 31.4	114 ± 34.64	30.3 ± 7.77	42 ± 28.78	19.7 ± 4.23	n.s
Estriments d'aproximació (n)	7.44 ± 1.34	4.11 ± 1.17	7.2 ± 1.57	5.1 ± 0.72	4.2 ± 0.88	4.4 ± 1.15	n.s
Entrada en el compartiment clar (latència, s)	169.3 ± 44.08	167.22 ± 45.02	128.2 ± 46.77	171.9 ± 43.98	217.5 ± 42.14	208 ± 40.59	n.s
Entrades en el compartiment clar (n)	1.33 ± 0.55	1.89 ± 0.90	4 ± 1.24	1.3 ± 0.68	1.6 ± 0.87	0.6 ± 0.27	n.s
Temps en el compartiment clar (s)	26.44 ± 14.26	38.89 ± 20.33	43.9 ± 15.54	13.6 ± 7.55	14.3 ± 7.91	6.2 ± 3.36^S	S*
Activitat vertical (latència, s)	145.8 ± 39.58	176.4 ± 32.47	119 ± 39.43	185.8 ± 44.77	88 ± 23.66	221.75 ± 42.24	n.s
Activitat horitzontal (n)	14.13 ± 6.48	16.88 ± 6.73	38.67 ± 12.63	26.4 ± 10.34	44.67 ± 5.22	11.4 ± 5.05	n.s
Activitat vertical (n)	2.6 ± 0.9	1.4 ± 0.51	6.83 ± 2.36	2.4 ± 1.2	3.33 ± 1.02	0.6 ± 0.28	n.s
Conducta d'empolainament (latència, s)	300 ± 0.00	259.4 ± 18.53	275.67 ± 18.75	300 ± 0.00	300 ± 0.00	300 ± 0.00	n.s
Conducta d'empolainament (s)	0 ± 0.00	1.2 ± 0.55	0.33 ± 0.26	0 ± 0.00	0 ± 0.00	0 ± 0.00	n.s
Defecacions (n)	0 ± 0.00	0.4 ± 0.18	0.67 ± 0.26	1 ± 0.55	0.33 ± 0.26	0 ± 0.00	n.s
Micció (incidència, %)	0	20	0	0	33.33	0	n.s
AMB DÒS COMPARTIMENTS							
Vertical activity (n)	7.89 ± 1.97	7.22 ± 1.92	13.3 ± 3.56	6.3 ± 1.36	4.9 ± 1.42	4.9 ± 0.96^S	S*
Defecacions (n)	2.11 ± 0.45	2.22 ± 0.66	1.8 ± 0.42	2.4 ± 0.54	1.5 ± 0.4	2 ± 0.37	n.s
Micció (incidència, %)	22.22	22.22	10	10	50	40	n.s

Taula 6. Efectes del tractament crònic de D-galactosa en ratolins mascles i femelles c57bl/6 als 6 mesos d'edat en el test de la caixa fosca/clara. Les dades s'expressen per mitjana ± SEM. ANOVA 2x3: S, efecte gènere; T, tractament * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$. *Post hoc* de la prova Duncan: ^S $p < 0,05$; ^{SS} $p < 0,01$ vs. el grup mascle corresponent.

Efectes del tractament crònic de D-gal en la caixa fosca/clara

A) Estiraments d'aproximació

B) Activitat en el compartiment il·luminat

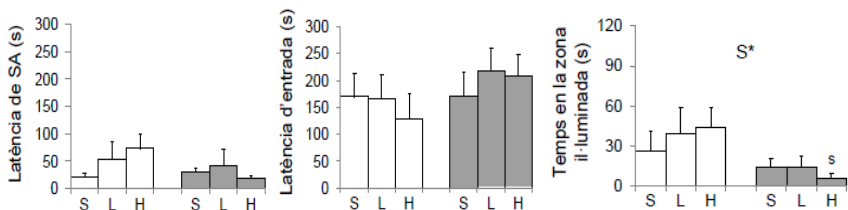


Figura 21. Efectes del tractament crònic de D-galactosa en ratolins mascles i femelles c57bl/6 als 6 mesos d'edat en el test de la caixa fosca/clara. Les dades s'expressen per mitjana ± SEM. Barres obertes: mascles; Barres tancades: femelles. S: salí, L: dosi baixa, 50mg/Kg de D-galactosa; H: dosi alta, 100mg/Kg de D-galactosa. ANOVA 2x3: S, efecte de gènere; * $p < 0,05$. *Post hoc* de la prova Duncan: ^S $p < 0,05$ vs. el grup mascle corresponent.

Funcions sensoriomotores i rotarod

Els animals tractats amb la dosi alta de D-galactosa van mostrar una menor latència de caiguda que els salins, com es mostra en la prova de la barra de fusta [Fig.22A; T, $F(2,52)=4,237$; $p<0,05$], sobretot observable en el gènere masculí [SxT, $F(2,52)=5,014$; $p<0,01$]. Quan va augmentar la complexitat de la tasca (prova de la barra de metall) tots els grups van mostrar pitjor equilibri, però com en la prova de la barra de fusta, es van trobar diferències significatives entre grup masculí de D-gal (H) en comparació amb els salins [Fig.22B; mascles H vs. S; $t(1,17)=2,451$, $p<0,05$]. En la prova del penja-robes, aquest grup també va mostrar diferències en la distància recorreguda [Fig.22C; mascles H vs. S; $t(1,17)=2,109$, $p<0,05$] que en resultà de la utilització dels diferents elements de suport (potes posteriors i cua) i la capacitat de coordinació.

Efectes del tractament crònic de D-gal en les proves sensoriomotores

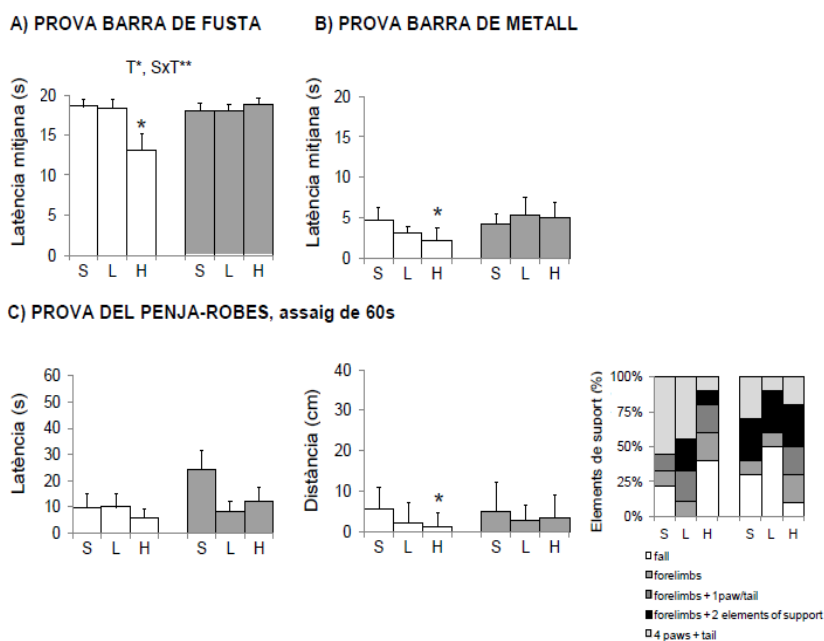


Figura 22. Efectes del tractament crònic de D-galactosa en ratolins mascles i femelles c57bl/6 als 6 mesos d'edat en el tests de les funcions sensoriomotores. Les dades s'expressen per mitjana \pm SEM. Barres obertes: mascles; Barres tancades: femelles. S: salí, L: dosi baixa, 50mg/Kg de D-galactosa; H: dosi alta, 100mg/Kg de D-galactosa. ANOVA 2x3: T, efecte tractament; SxT, interacció gènere x tractament; * $p<0,05$, ** $p<0,01$. *Post hoc* de la prova Duncan: * $p<0,05$ vs. el grup salí corresponent.

L'equilibri i la coordinació es van valorar també en el rotarod. Els resultats van mostrar diferències segons el gènere [S, $F(1,52)=3,959$; $p<0,05$], el tractament rebut [T, $F(2,52)=7,261$; $p<0,01$] i una interacció 'gènere x tractament' [SxT, $F(2,52)=3,929$; $p<0,05$] en el nombre d'assajos necessaris per aprendre a caminar pel carril i el nombre de voltes fetes sobre el rotarod un cop apresada la tasca [SxT, $F(2,52)=3,536$; $p<0,05$]. Els mascles tractats amb la dosi baixa van augmentar les seves habilitats motores en comparació amb el seu grup salí (Fig.23). Les diferències trobades en l'equilibri i la coordinació motora no van estar influenciades del pes corporal ja que el tractament no el va modificar [T, GxT; $F(2,52)<0,687$; $p>0,508$, *n.s.*].

Efectes del tractament crònic de D-gal en el rotarod

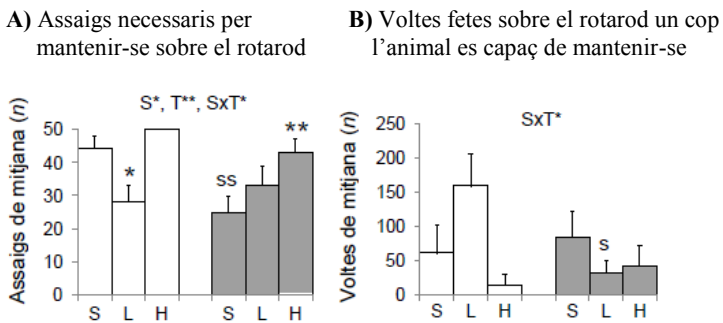


Figura 23. Efectes del tractament crònic de D-galactosa en ratolins mascles i femelles c57bl/6 als 6 mesos d'edat en el test del rotarod. Les dades s'expressen per mitjana \pm SEM. Barres obertes: mascles; Barres tancades: femelles. S: salí, L: dosi baixa, 50mg/Kg de D-galactosa; H: dosi alta, 100mg/Kg de D-galactosa. ANOVA 2x3: S, efecte gènere; T, efecte tractament; SxT, interacció gènere x tractament; * $p<0,05$, ** $p<0,01$. *Post hoc* de la prova Duncan: ^s $p<0,05$, ^{ss} $p<0,01$ vs. el grup mascle corresponent; * $p<0,05$, ** $p<0,01$ vs. el grup salí corresponent.

Test del laberint en T

Tots els animals presentaren latències similars en l'assoliment del criteri de la tasca d'alternança espontània [totes les $F(1,52) < 1,692$; $p > 0,05$] (Taula.7). En la memòria de treball, que inclou l'assaig d'elecció forçada i el de memòria o evocació, tots els grups van assolir el criteri d'exploració de manera similar [totes les $F(1,52) < 2,665$; $p > 0,05$], tot i que no tots van completar la tasca. De manera similar, en la tasca de memòria o evocació, només aquells animals que van assolir el criteri d'exploració en la tasca anterior, van poder realitzar aquest segon assaig. A més, l'elevat percentatge d'animals que no van completar l'assaig de memòria impossibilità l'anàlisi estadística d'aquesta última prova.

	M NTg S (n=9)	M NTg 50mg/kg (n=9)	M NTg 100mg/kg (n=10)	F NTg S (n=10)	F NTg 50mg/kg (n=10)	F NTg 100mg/kg (n=10)	Estad.
PROVA DE L'ALTERNANÇA ESPONTÀNIA							
Conduïda de petrificació (s)	23.56±14.78	12.44±4.58	9.90±2.87	9.1±3.2	6.5±2.33	7.6±2.37	n.s
Intersecció de la T (latència, s)	130.78±40.17	106.33±35.06	94.50±35.61	44.4±24.35	91.7±37.2	50.6±28.12	n.s
Exploració dos braços de la T (latència, s)	218.78±42.08	161.56±41.88	135.89±38.29	112.2±37.27	173.6±40.05	174.7±32.85	n.s
PROVA DE LA MEMÒRIA DE TREBALL							
<i>Assaig d'elecció forçada</i>							
Intersecció de la T (latència, s)	76.33±34.57	90.55±37.95	116.10±44.64	56.70±28.12	121.30±42.42	173.70±42.64	n.s
Assoliment del criteri (freqüència, n/total)	6/9	7/9	5/10	9/10	5/10	5/10	n.s
Criteri d'exploració (latència, s)	153.33±40.68	127.44±33.99	176.30±42.14	112.80±32.20	204.30±33.85	216.20±33.03	n.s
<i>Assaig de memòria</i>							
Assoliment del criteri (freqüència, n/total)	4/6	6/7	5/5	8/9	3/5	4/5	n.s
Errors (freqüència, n/total)	1/4	3/6	3/5	4/8	1/3	0/4	n.s

Taula 7. Efectes del tractament crònic de D-galactosa en ratolins mascles i femelles c57bl/6 als 6 mesos d'edat en el test de laberint en T. Les dades s'expressen per mitjana ± SEM.

Laberint aquàtic de Morris

En la tasca d'aprenentatge guiat, la variable distància va revelar un efecte de gènere i una interacció de 'gènere x tractament' [Fig. 24C, S, $F(1,52)=4,419$; $p < 0,05$ i $S \times T$, $F(2,52)=3,397$; $p < 0,05$] que no es va trobar utilitzant la latència mitjana d'escapament. Una anàlisi detallada 'assaig per assaig' va permetre detectar diferències en aquesta tasca. En el primer assaig, que implica la primera experiència pels animals en el laberint, les femelles van trigar més temps i van recórrer una major distància per trobar la plataforma [latència i distància T1; S, ambdues $F(1,52) > 13,910$; $p < 0,001$] a causa de la dificultat que van mostrar les femelles tractades per trobar la plataforma [latència i distància de T1, T, $F(2,52) > 10,469$; $p < 0,001$].

En la tasca de localització, l'efecte temps va indicar la presència d'un procés d'adquisició per a les dues variables de latència mitjana [Fig.24A i E; RMA, t, $F(3,156)=26,716$, $p<0,001$] i la distància recorreguda [Fig.24C i G; RMA, t, $F(3,135)=9,703$, $p<0,001$]. Només l'anàlisi 'assaig per assaig' (Fig.24B, D, F i H) va permetre trobar diferències de gènere en el primer dia de la tasca de localització, on les femelles mostraren una major distància recorreguda [PT1; S, $F(3,42)>5,548$, $p<0,05$]. D'altra banda, es van trobar un efecte temps, i interaccions 'temps x tractament' i 'temps x gènere x tractament' durant la progressió de la tasca de localització, quan s'utilitzà la variable de latència [PT3; t, $F(2,78)>3,628$, $p<0,05$ i txT, $F(4,78)>3,425$, $p<0,01$; PT4; txSxT, $F(4,78)>3,681$, $p<0,05$]. El nivell d'adquisició assolit al final de la tasca va ser similar en tots els grups, independentment del gènere i el tractament administrat [latència, PT4.T3, totes les $F(1,42)<2,756$; $p>0,05$, *n.s.*; distància recorreguda, PT4.T3, totes les $F(1,42)<2,270$; $p>0,05$, *n.s.*]. No es van trobar diferències en la velocitat de natació en les tasques d'aprenentatge guiat ni de localització (dades no mostrades).

En l'assaig de memòria final (Fig.26), ambdós gèneres dels animals tractats amb la dosi alta de D-gal van mostrar una major preferència pel quadrant que contenia la plataforma [temps i distància en P *vs.* tots els altres quadrants; ANOVA, tots les $F>4.127$ $p<0,01$] i una major precisió de localització de la plataforma [creuaments de l'anella; P *vs.* tots els altres quadrants; ANOVA, $F>2.893$ $p<0,05$] que els seus comparat amb els seus grups salins. Aquestes diferències no van ser atribuïbles a les diferències en la velocitat de natació.

Efectes del tractament crònic de D-gal en les tasques d'aprenentatge guiat i de localització

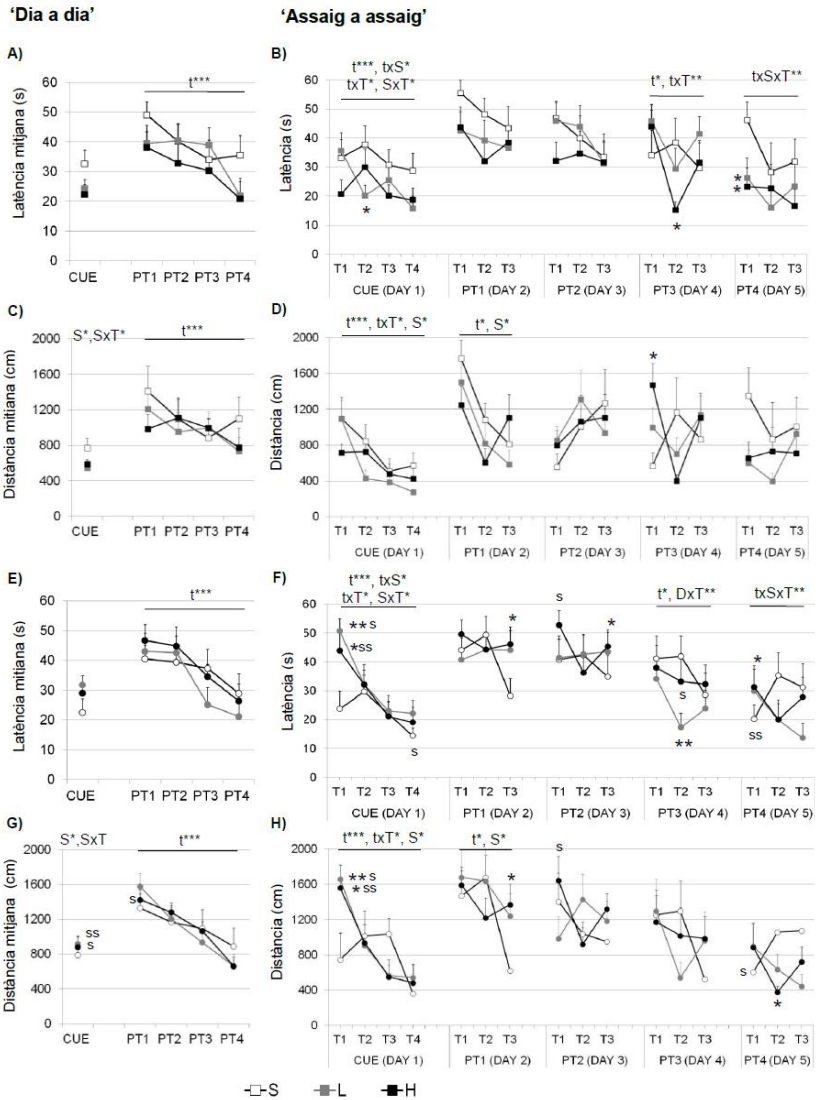


Figura 24. Anàlisi quantitatives de les tasques d'aprenentatge guiat i de localització en el MWM en ratolins mascles (A-D) i femelles (E-H) NTg veh vs. D-Gal als 6 mesos d'edat. Les dades s'expressen per mitjana \pm SEM. ANOVA 2x3: S, efecte gènere; T, efecte tractament; t, efecte temps; SxT, interacció gènere x tractament; txS, interacció temps x gènere; txT, interacció temps x tractament; txSxT, interacció temps x gènere x tractament; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. *Post hoc* de la prova Duncan: ^s $p < 0,05$, ^{SS} $p < 0,01$ vs. el grup mascle corresponent; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ vs. el grup salí corresponent.

Efectes del tractament crònic de D-gal en la prova de memòria final

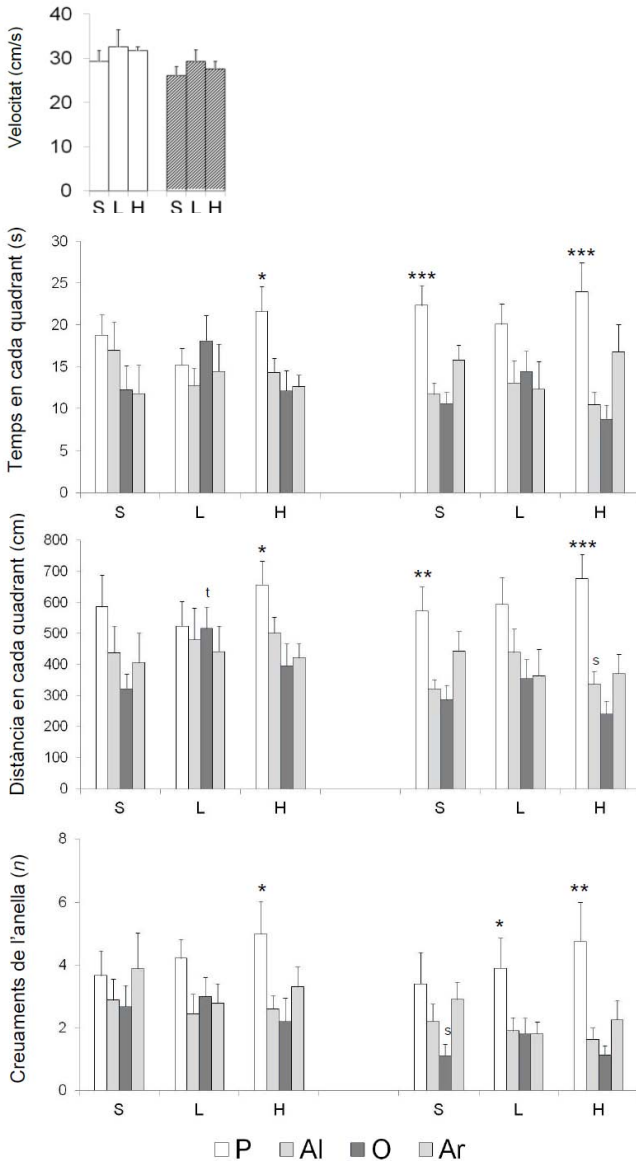


Figura 25. Anàlisi quantitativa de l'assaig de memòria final en el MWM en ratolins mascles (esquerra) i femelles (dreta) c57bl/6 als 6 mesos d'edat. Les dades s'expressen com a mitjana \pm SEM del temps, distància i creuaments de l'anella en els quadrants de la plataforma (P), adjacent esquerre (AI), oposat (O) i adjacent dret (Ar). Velocitat de navegació en aquesta prova. Prova de *t*-Student: ^s $p < 0,05$ vs. el grup mascle corresponent; ^t $p < 0,05$ vs. el grup salí corresponent. ANOVA, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ P vs. tots els altres quadrants.

8.3 Discussió

S'ha demostrat que l'administració crònica de D-galactosa afecta a la funció mitocondrial, causant un augment de la producció de radicals lliures en el cervell (Song *et al.*, 1999), sobretot en àrees amb gran sensibilitat a l'estrès oxidatiu, com el còrtex cerebral, l'hipocamp i l'estriat (Beckman i Ames, 1998). I, com a conseqüència, ocasiona una disminució progressiva de la capacitat d'aprenentatge i memòria i de les habilitats motores (Lei *et al.*, 2008). Des de fa gairebé vint anys, aquests efectes induïts per la D-galactosa han servit com una eina de treball per aconseguir models d'envelliment accelerat (Li *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 1996). Alguns laboratoris han aconseguit que els animals tractats amb D-gal presentin dèficits cognitius (Zhang *et al.*, 2005; Cui *et al.*, 2006) i/o una disminució de les habilitats motores (Banji *et al.*, 2013). No obstant, aquests resultats són controvertits, ja que no tots els estudis els han aconseguit replicar. Aquesta situació discrepant es deu principalment a la gran diversitat de dissenys experimentals existents, els quals dificulten la convergència de resultats. De fet, un estudi recent va analitzar alhora els efectes del tractament crònic de D-gal en diferents edats i en ambdós sexes de ratolins i va demostrar que el dèficit cognitiu associat al tractament de D-galactosa depenia de la durada del tractament, juntament amb els factors gènere i edat (Hao *et al.*, 2014). Tot i així, no hi ha cap estudi que hagi analitzat exhaustivament els efectes de la D-gal en el conjunt dels diferents dominis conductuals. Així doncs, l'Estudi III d'aquesta tesi doctoral és el primer treball experimental que es planteja avaluar en detall els efectes de la D-gal, incloent les funcions sensoriomotores, l'activitat exploratòria, comportaments relacionats amb el perfil ansiós, així com l'aprenentatge i la memòria. La valoració s'ha fet en la soca de ratolins estàndard c57bl/6, en ambdós gèneres, després de 8 setmanes de tractament subcutani. El model de D-galactosa, que la literatura descriu com a model d'envelliment accelerat, està establert en base a la dosi de 100 mg/kg. Aquí, s'han avaluat els efectes conductuals de la dosi resposta 0-50-100 mg/Kg.

Els resultats d'aquest estudi indiquen que la dosi de 100mg/Kg de D-galactosa emula els efectes motors de l'envelliment empitjorant l'equilibri i la coordinació motora dels mascles en les proves sensoriomotores. La funció motora de les femelles avaluada en el rotarod també es va veure afectada de forma significativa amb la dosi de 100mg/Kg mostrant, a més, una tendència en la incapacitat de mantenir-se en el rotarod (nombre de voltes) ja en la dosi de 50mg/Kg. Diversos estudis han demostrat que les habilitats motores i, en

particular, les habilitats de coordinació sobre el rotarod, disminueixen amb envelliment natural (Wallace *et al.*, 1980; Shukitt-Hale *et al.*, 1998). Aquests resultats estan d'acord amb estudis previs, on s'ha observat que el tractament crònic de D-galactosa és capaç d'accelerar aquestes disfuncions en animals joves (p.ex., Lei *et al.*, 2003; Banji *et al.*, 2013).

Alguns autors suggereixen que el tractament crònic amb D-gal només afecta algunes funcions, més que causar un envelliment general prematur (He *et al.*, 2009; Chang *et al.*, 2014) mentre que d'altres investigadors consideren que el tractament no ocasiona cap tipus d'afectació (Parameshwaran *et al.*, 2010). Així, mentre que alguns laboratoris han aconseguit que els animals tractats amb D-gal presentin dèficits cognitius (Zhang *et al.*, 2005; Cui *et al.*, 2006) i/o una disminució de les habilitats motores (Banji *et al.*, 2013), existeix controvèrsia perquè no tots els estudis han aconseguit replicar-ho (He *et al.*, 2009; Parameshwaran *et al.*, 2010; Chang *et al.*, 2014). Aquest també és el cas en aquest Estudi III, on la D-gal no va tenir efectes sobre l'aprenentatge espacial en la tasca de localització. És més, en la tasca d'aprenentatge guiat, la D-gal va exercir efectes positius similars en els mascles, independentment de la dosi administrada. Així, els mascles van necessitar menys temps i van recórrer una menor distància per arribar a la plataforma. Aquesta tasca implica un aprenentatge perceptiu visual, amb la qual cosa, aquests resultats suggereixen una millora de la capacitat d'atenció o percepció visual en aquests animals i/o també de la motivació. En l'assaig de memòria final, justament és la dosi alta de D-gal la que va ser capaç de potenciar la discriminació del quadrant que contenia la plataforma, i en el cas de les femelles, ho va fer amb una major precisió, tal i com va indicar l'augment en el nombre de creuaments de l'anella. Aquests resultats d'aprenentatge i memòria paradoxals segons el model d'envelliment induït per D-galactosa podrien atribuir-se al disseny experimental o el fet de que la majoria dels estudis realitzats que han reportat dèficits cognitius han utilitzat la soca Kunming (p.ex., Lu *et al.*, 2007; Chiu *et al.*, 2009; He *et al.*, 2009; Luo *et al.*, 2009; Shan *et al.*, 2009); mentre que en la soca c57bl/6, alguns mostren dèficits (Wei *et al.*, 2005; Yoo *et al.*, 2011) i altres no (Parameshwaran *et al.*, 2010; Chang *et al.*, 2014). De fet, un estudi recent va analitzar alhora els efectes del tractament crònic de D-gal en diferents edats i en ambdós gèneres de ratolins de la nostra mateixa soca c57bl/6 i va demostrar que el dèficit cognitiu associat al tractament de D-galactosa depenia de la durada del tractament, juntament amb els factors gènere i edat (Hao *et al.*, 2014). No obstant aquesta argumentació no explicaria per què en l'aprenentatge guiat, els

mascles mostren una millora amb totes dues dosis i les femelles ho fan amb la dosi de 100mg/Kg en l'assaig de memòria final. Aquí caldria considerar, en tot cas, quin paper hi poden jugar els nivells d'ansietat i si el tractament amb la D-gal la podria haver potenciat. De fet, tal com hem vist en l'Estudi II, un increment de l'ansietat com és el que mostren els 3xTg-AD o els mateixos NTg tractats amb cafeïna, és un element que interfereix en l'execució i rendiment de la prova. Però aquest tampoc és el cas, perquè la D-galactosa en aquests mateixos animals no mostra cap efecte sobre l'ansietat i l'emotivitat, mesurades en les proves de l'OF i la DLB. És més, en aquest estudi es van analitzar per primera vegada l'efecte de la D-gal en les conductes bizarres i es va veure que la dosi de 50mg/Kg va ser capaç de disminuir-les. En el mateix sentit, pel que fa a l'activitat exploratòria desenvolupada en l'OF, en el gènere masculí la D-gal va augmentar tant l'activitat horitzontal com la vertical, un efecte que seria contrari al propi de l'envelliment (Baeza *et al.*, 2010). En els mascles tractats amb 50mg/Kg de D-gal, aquest efecte es va veure corroborat per la millora obtinguda en la capacitat motora (tant d'aprenentatge com de coordinació) en el rotarod. D'altra banda cal considerar també que en alguns tests d'ansietat, com l'OF, existeix un efecte contundent del factor 'soca' tal com demostra un estudi recent en vuit soques pures de ratolí, que estableix un rànquing d'ansietat en funció del fons genètic (Lad *et al.*, 2010). Així doncs, alguns autors han suggerit que els resultats obtinguts amb D-gal en l'OF podrien variar segons la soca utilitzada (Parameshwaran *et al.*, 2010). Aquest fet permet entendre perquè certs estudis, inclòs aquest mateix Estudi III, discrepen a l'hora de demostrar si la D-gal indueix canvis (Xu i Zhao, 2002; Lu *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2007, 2008) o no (Kumar *et al.*, 2010) en la conducta exploratòria en l'OF. I és en aquest escenari de susceptibilitat diferencial on l'estudi dels efectes de la D-gal en soques mutants per a malalties neurològiques i/o psiquiàtriques que impliquen deteriorament físic, cognitiu o tipus BPSD resulta molt interessant.

8.4 Conclusions

Les conclusions de l'Estudi III per a la *Caracterització conductual de l'administració crònica amb D-galactosa en ratolins c57bl/6*, en mascles i femelles a 6 mesos d'edat, van ser les següents:

1. La dosi de 100mg/Kg de D-galactosa va empitjorar l'equilibri en les barres en els mascles i la coordinació motora en el rotarod en tots dos gèneres, emulant els efectes de l'envelliment a nivell motor.
2. Les femelles van ser més susceptibles a la D-gal ja que amb la dosi de 50mg/Kg s'observà una tendència en la incapacitat de mantenir-se en el rotarod.
3. En la tasca de localització del MWM, no es van trobar diferències causades pel tractament amb D-galactosa. Però, en la tasca d'aprenentatge guiat, tant la dosi de 100 com la de 50mg/Kg de D-gal van exercir efectes positius en els mascles. En l'assaig de memòria final, la dosi de 100mg/Kg va millorar la capacitat de discriminació de l'anella en les femelles.
4. Les dues dosis de D-galactosa van augmentar l'activitat exploratòria en el camp obert en el gènere masculí. En les femelles, la D-galactosa va disminuir les conductes bizarres, encara que només es va assolir significació estadística en la dosi de 50mg/Kg.
5. D-galactosa no va mostrar cap efecte sobre l'ansietat i l'emotivitat avaluades en el camp obert i en la caixa fosca/clara.

Aportacions i conclusions generals

9. Aportacions de la tesi i conclusions generals

La malaltia d'Alzheimer, el tipus més comú de demència senil, es caracteritza per la pèrdua progressiva de les funcions cognitives i l'aparició d'alteracions conductuals que poden repercutir en les activitats de la vida diària. D'altra banda, dins de la complexitat clínica pròpia de l'AD, els símptomes neuropsiquiàtrics associats a la demència són bastant prevalents entre els pacients de l'AD (Reisberg *et al.*, 1987) sent la font principal de patiment dels pacients, alhora que una càrrega física i mental per a la família i per als professionals (Tan *et al.*, 2005). Avui en dia, la majoria dels enfocaments terapèutics estan centrats en fer front al declivi cognitiu característic a la malaltia, sovint deixant en segon pla els símptomes conductuals i psicològics de les demències, malgrat que aquests trastorns neuropsiquiàtrics són els principals causants de la institucionalització primerenca (Hope *et al.*, 1998).

El principal factor de risc en la malaltia d'Alzheimer (AD), la demència senil més freqüent, és l'edat i presenta major incidència en el gènere femení. En la seva aparició, se li atribueixen també altres factors de risc, tant biològics (genètics i no genètics) com ambientals. La seva forma familiar heretada genèticament (FAD), que es presenta en menys del 5% dels casos, i l'espòradica, majoritària i d'etiologia desconeguda, acostumen a mostrar un patró temporal diferent pel que fa a l'edat d'inici i la taxa de progressió del procés neurodegeneratiu. Per tant, es classifiquen també com a AD d'aparició primerenca (edat d'inici < 65 anys), i AD d'aparició tardana (edat d'inici > 65 anys), respectivament. Tot i això, el fet que comparteixin els mateixos símptomes clínics cognitius i els conductuals i psicològics associats a la demència (BPSD) així com processos neuropatològics subjacents, ha permès a nivell experimental, la utilització de models animals de tipus genètic portadors dels transgens humans per a l'avenç en l'estudi de la malaltia.

Els ratolins 3xTg-AD (PS1_{M146V}, APP_{Swe} i tau_{P301L}), creats pel laboratori de Laferla (UCI, USA, 2003), que desenvolupen de forma progressiva els trets neuropatològics β A i tau característics de la malaltia, amb un perfil temporal i neuroanàtom ic similar al que es presenta en els pacients, han estat els subjectes experimentals d'aquesta tesi doctoral. En l'Estudi I, aquest model animal ha permès estudiar l'impacte del factor genètic i del gènere en l'expressió de les conductes bizarres, fins ara no caracteritzades, com a part del seu patró de tipus BPSD primerenc als 6 mesos d'edat. Alhora, en aquest primer estudi, s'han avaluat els efectes beneficiosos a llarg termini d'una estimulació ambiental de tipus sensorial tàctil administrada durant l'ontogènia: el handling postnatal, posant especial èmfasi en les conductes de tipus

BPSD. Després, es va estudiar els efectes de l'administració crònica de cafeïna emulant allò que en una bona part de la població adulta forma part dels seus hàbits de vida però, d'altra banda, pot ser considerada un tractament farmacològic. Finalment, tenint en compte que l'edat és el principal factor de risc per desenvolupar la malaltia d'Alzheimer, el darrer estudi d'aquesta tesi va valorar els efectes dosi resposta la D-galactosa, un model farmacològic d'envelliment accelerat, en les diferents dimensions conductuals estudiades. Aquestes aproximacions experimentals van, a més, requerir la caracterització fenotípica de la soca control i transgènica, sent necessari, fins i tot, fer noves aportacions metodològiques per a la identificació de conductes com les bizarres i de patrons conductuals (estratègies de navegació), que permetessin distingir els genotips. Finalment, és interessant assenyalar que en la seva vessant translacional s'incorpora el factor el gènere i el valor longitudinal dels dissenys experimentals.

El primer estudi d'aquesta tesi doctoral va permetre caracteritzar les conductes bizarres, que tot i haver estat observades sistemàticament en tests d'ansietat clàssics incondicionats, la seva baixa incidència i durada havien dificultat la seva mesura. Als 6 mesos d'edat, es van trobar les condicions experimentals adequades per a avaluar-les en els animals NTg, especialment en el gènere femení, i demostrar que estaven emfatitzades en els ratolins 3xTg-AD, que en aquesta edat es troben en les fases inicials de la malaltia. A més, la validesa convergent a nivell metodològic del disseny experimental va permetre correlacionar les conductes bizarres i la conducta de la valoració del risc amb altres variables relacionades amb l'ansietat, la locomoció i l'emotivitat. Aquesta identificació i quantificació de les conductes bizarres ha permès incorporar-les com un dels BPSD ja presents en el fenotip conductual dels 3xTg-AD des dels estadis primerencs. I per tant, ens han estat útils per avaluar, a nivel experimental, els efectes d'estratègies preventives (handling postnatal), terapèutiques (cafeïna) per a la malaltia així com per a avaluar factors de risc (D-galactosa).

La capacitat del handling postnatal per modificar, a llarg termini, el fenotip dels animals NTg i 3xTg-AD va quedar demostrada en els seus efectes reduint la conducta de petrificació i les conductes bizarres, mentre que potencià la conducta de valoració del risc, sobretot en el gènere femení. L'Estudi I va demostrar també que el handling exerceix efectes selectius, actuant sobre les 'estratègies per fer front a l'estrès', sense modificar l'activitat exploratòria *per se*.

Tenint en compte que la cafeïna exerceix efectes farmacològics estimulants però també ansiogènics i que els efectes d'aquest hàbit de

vida són més acusats en els homes que en les dones, s'ha volgut verificar si els efectes cognitius que ara se li atribueixen en vers a la malaltia serien extensibles si existeix un perfil BPSD accentuat com el que mostra aquest model animal. D'entre les estratègies amb potencial terapèutic cognitiu vinculades als estils i hàbits de vida, vam considerar important avaluar a nivell translacional els efectes del consum crònic de cafeïna. Aquest plantejament experimental té com a valor addicional, el fet que la cafeïna exerceix efectes farmacològics de tipus ansiogènec però el seu impacte sobre els perfils BPSD ha estat poc estudiat. Per tant, la bateria de tests conductuals avaluà els efectes del tractament en el pes, les funcions sensoriomotores, l'activitat exploratòria, l'emocionalitat i conductes relacionades amb l'ansietat, el ritme circadià i l'aprenentatge i memòria. L'estudi demostrà que el tractament crònic amb una dosi baixa de cafeïna va modificar la major part de les variables estudiades, principalment aquelles relacionades amb l'ansietat, la neofòbia, l'emotivitat i la flexibilitat cognitiva. En particular, la cafeïna va incrementar la neofòbia i altres conductes del perfil ansiós, que en el cas del model 3xTg-AD es va traduir en un agreujament del seu patró BPSD. També va alterar el ritme circadià en els animals 3xTg-AD, incrementant l'activitat motora. L'estudi també demostrà que aquest mateix escenari és el que va interferir en la distinció dels genotips en la prova del MWM i la valoració dels efectes cognitius de la cafeïna en base a les variables de latència i distància. És per això que es va haver de fer un estudi qualitatiu i quantitatiu de les diferents estratègies de natació (Estudi II. Fase 1) que és el que va permetre distingir els genotips en base a criteris d'estratègies de no cerca (NTg: flotació; 3xTg-AD: natació en cercle) i el nombre i tipus d'estratègies de cerca (NTg: úniques i dirigides; 3xTg-AD: mixtes i no dirigides). És justament en aquestes característiques distintives en les estratègies mostrades pels dos genotips on la cafeïna va demostrar efectes positius fent que el grup 3xTg-AD utilitzés estratègies de cerca equivalents a les dels dos grups NTg.

Per tant, aquest estudi demostra que el tractament crònic amb cafeïna augmenta el perfil ansiós dels ratolins NTg i exacerba el perfil BPSD dels 3xTg-AD amb poc marge de benefici cognitiu. Això suggereix que a l'hora de valorar el consum de cafeïna com a possible estratègia preventiva o terapèutica cal tenir en compte el perfil ansiós de l'individu i, en el cas dels pacients, la presència de símptomes neuropsiquiàtrics.

Finalment, donat que l'edat és el principal factor de risc per a desenvolupar l'AD de tipus esporàdic, es va estudiar un model

farmacològic d'envelliment accelerat basat en l'increment de l'estrès oxidatiu induït per l'administració crònica *s.c.* de 100mg/Kg de D-galactosa durant 56 dies. En aquesta tesi doctoral es presenten els resultats de la verificació d'aquest model d'envelliment en la soca NTg c57bl/6, que és la que s'ha utilitzat com a base genètica per a nova colònia de ratolins 3xTg-AD. Per això es va estudiar la dosi resposta 0-50-100mg/Kg, utilitzant una bateria que valora diferents dimensions conductuals i tenint en compte el gènere. De forma general, els efectes van ser dependents del gènere i de les proves. Com a model farmacològic d'envelliment, els efectes només es van observar a nivell d'equilibri en els mascles i coordinació motora en ambdós gèneres. Per contra, la D-galactosa va mostrar efectes positius dosi dependents en altres dimensions com l'activitat exploratòria en els mascles, les conductes bizarres en les femelles així com algunes tasques d'aprenentatge i memòria de forma dependent del gènere. Aquesta caracterització dels efectes dosi resposta del tractament crònic amb D-galactosa ha permès definir el disseny experimental per al seu estudi en els ratolins 3xTg-AD, utilitzant la dosi de 100mg/Kg com a model d'envelliment i la de 50mg/Kg com a potencialment protectora. Alhora aquesta dualitat d'efectes de la D-galactosa fa que resulti també interessant en l'estudi de l'envelliment i altres malalties neurodegeneratives.

En l'apartat d'annexos s'inclou el pòster amb resultats preliminars que indiquen que els ratolins 3xTg-AD mostren la mateixa resposta en la prova de la sacsejada de la cua en aigua freda que els animals NTg, resposta que amb l'edat es veu alentida en tots dos genotips. Encara que es tracta només d'un estudi pilot, s'ha volgut incloure com a annex en aquesta tesi per la seva transcendència translacional en l'estudi del dolor en pacients amb dèficit cognitiu i/o demència.

Referències bibliogràfiques

10. Referències bibliogràfiques

Adebisi, S. A., & Oghagbon, E. K. (2003). Prevalence of obesity among diabetics in Ilorin, Middle Belt of Nigeria. *Sahel Medical Journal*, 6(4):112-115.

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

Aguilar, R., Gil, L., Fernández-Teruel, A., & Tobeña, A. (2004). Genetically-based behavioral traits influence the effects of shuttle box avoidance overtraining and extinction upon intertrial responding: A study with the roman rat strains. *Behavioural Processes*, 66(1), 63-72.

Ambrée, O., Touma, C., Görtz, N., Keyvani, K., Paulus, W., Palme, R., & Sachser, N. (2006). Activity changes and marked stereotypic behavior precede A pathology in TgCRND8 alzheimer mice. *Neurobiology of Aging*, 27(7), 955-964.

American Psychiatric Association. Task force on DSM-IV. and American Psychiatric Association., Diagnostic and statistical manual of mental disorders DSM-IV-TR. 4th ed. 2000, Whashington, DC: American Psychiatric Association. xxxvii, 943.

Anand R., Gill K.D, Mahdi A.A. (2014). Therapeutics of Alzheimer's disease: Past, present and future. *Neuropharmacology*. 76 Pt A:27-50.

Anderson, N. L., & Hughes, R. N. (2008). Increased emotional reactivity in rats following exposure to caffeine during adolescence. *Neurotoxicology and Teratology*, 30(3), 195-201.

Anisman, H., Zaharia, M. D., Meaney, M. J., & Merali, Z. (1998). Do early-life events permanently alter behavioral and hormonal responses to stressors? *International Journal of Developmental Neuroscience*, 16(3-4), 149-164.

Arendash, G. W., Schleif, W., Rezai-Zadeh, K., Jackson, E. K., Zacharia, L. C., Cracchiolo, J. R., Tan, J. (2006). Caffeine protects alzheimer's mice against cognitive impairment and reduces brain beta-amyloid production. *Neuroscience*, 142(4), 941-952.

Arendash, G. W., Mori, T., Cao, C., Mamcarz, M., Runfeldt, M., Dickson, A., Potter, H. (2009). Caffeine reverses cognitive impairment and decreases brain amyloid-beta levels in aged alzheimer's disease mice. *Journal of Alzheimer's Disease: JAD*, 17(3), 661-680

Arkin S. (2007). Language-enriched exercise plus socialization slows cognitive decline in Alzheimer's disease. *Am J Alzheimers Dis Other Demen*, 22:62-77.

Arranz, L., De Castro, N. M., Baeza, I., Giménez-Llort, L., & De la Fuente, M. (2011). Effect of Environmental Enrichment on the Immunoendocrine Aging of Male and Female Triple-Transgenic 3xTg-AD Mice for Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, 25(4), 727–737.

Arvanitakis, Z., Schneider, J. A., Wilson, R. S., Li, Y., Arnold, S. E., Wang, Z., & Bennett, D. A. (2006). Diabetes is related to cerebral infarction but not to AD pathology in older persons. *Neurology*, 67(11), 1960–5.

Baeta-Corral, R., & Giménez-Llort, L. (2014). Bizarre behaviors and risk assessment in 3xTg-AD mice at early stages of the disease. *Behavioural Brain Research* 258, 97-105.

Baeta-Corral, R., Pick, C.G. & Giménez-Llort, L. (2014) Progression of BPSD-like symptoms and pain perception in aging and Alzheimer's disease: studies in 3xTg-AD mice. 6th International Conference on Pain and Impaired Cognition. Aalborg, Denmark.

Baeza, I., De Castro, N. M., Giménez-Llort, L., & De la Fuente, M. (2010). Ovariectomy, a model of menopause in rodents, causes a premature aging of the nervous and immune systems. *Journal of Neuroimmunology*, 219(1-2), 90–9.

Banji, D., Banji, O. J. F., Dasaroju, S., & Kranthi, K. C. H. (2013). Curcumin and piperine abrogate lipid and protein oxidation induced by D-galactose in rat brain. *Brain Research*, 1515, 1–11.

Barabash A, Marcos A, Ancin I, Vazquez-Alvarez B, de Ugarte C, Gil P, et al. (2009). APOE, ACT and CHRNA7 genes in the conversion from amnesic mild cognitive impairment to Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 30(8): 1254–64.

Barak, B., Okun, E., Ben-Simon, Y., Lavi, A., Shapira, R., Madar, R., Ashery, U. (2013). Neuron-specific expression of tomosyn1 in the mouse hippocampal dentate gyrus impairs spatial learning and memory. *Neuromolecular Medicine*, 15(2), 351–63.

Barnes LL, Mendes de Leon CF, Wilson RS, Bienias JL, Evans DA. (2004). Social resources and cognitive decline in a population of older African Americans and whites. *Neurology*, 63(12):2322–2326.

Barron A.M., Rosario E.R., Elteriefi R., Pike C.J.(2013). Sex-specific effects of high fat diet on indices of metabolic syndrome in 3xTg-AD mice: implications for Alzheimer's disease. *PLoS One*. 8, e78554.

Beckman K.B., Ames B.N. (1998). The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev*.78, 547-81.

Benedetti F., Vighetti S., Ricco C., et al. (1999). Pain threshold and tolerance in Alzheimer's disease. *Pain* 80, 377–82.

- Billings L.M., Oddo S., McGaugh J.L., LaFerla F.M. (2005). Intraneuronal A β causes the onset of early Alzheimer's disease-related cognitive deficits in transgenic mice. *Neuron*, 45, 675-88.
- Bizon J., Prescott S., Nicolle M.M. (2007). Intact spatial learning in adult Tg2576 mice. *Neurobiol Aging*, 28, 440-6.
- Blázquez G., Cañete T., Tobeña A., Giménez-Llort L., Fernández-Teruel A. (2014). Cognitive and emotional profiles of aged Alzheimer's disease (3 \times TgAD) mice: effects of environmental enrichment and sexual dimorphism. *Behav Brain Res* 268,185-201.
- Blom ES, Giedraitis V, Zetterberg H, Fukumoto H, Blennow K, Hyman BT, et al. (2009). Rapid progression from mild cognitive impairment to Alzheimer's disease in subjects with elevated levels of tau in cerebrospinal fluid and the APOE epsilon4/epsilon4 genotype. *Dement Geriatr Cognit Disord*, 27(5): 458–64.
- Borenstein, A. R., Copenhaver, C. I., & Mortimer, J. A. (2006). Early-life risk factors for Alzheimer disease. *Alzheimer Disease and Associated Disorders*, 20(1), 63–72.
- Bouffleur, N., Antoniazzi, C. T., Pase, C. S., Benvegna, D. M., Dias, V. T., Segat, H. J., et al. (2012). Neonatal handling prevents anxiety-like symptoms in rats exposed to chronic mild stress: Behavioral and oxidative parameters. *Stress (Amsterdam, Netherlands)*.
- Bourin, M., & Hascoet, M. (2003). The mouse light/dark box test. *European Journal of Pharmacology*, 463(1-3), 55-65.
- Brodady H, Arasaratnam C.(2012). Meta-analysis of nonpharmacological interventions for neuropsychiatric symptoms of dementia.*Am J Psychiatry*. 169, 946-53.
- Brody, D. L., & Holtzman, D. M. (2006). Morris water maze search strategy analysis in PDAPP mice before and after experimental traumatic brain injury. *Experimental Neurology*, 197(2), 330–40.
- Broekkamp, C. L., Rijk, H. W., Joly-Gelouin, D., & Lloyd, K. L. (1986). Major tranquillizers can be distinguished from minor tranquillizers on the basis of effects on marble burying and swim-induced grooming in mice. *European Journal of Pharmacology*, 126(3), 223–9.
- Brookmeyer, R., Johnson, E., Ziegler-Graham, K., & Arrighi, H. M. (2007). Forecasting the global burden of Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association*, 3(3), 186–91.
- Bucala R, Cerami A. (1992). Advanced glycosylation: chemistry, biology, and implications for diabetes and aging. *Adv Pharmacol*. 23,1-34.

- Buckholtz N.S. (2001). Perspective: in search of biomarkers. *Nature* 13, 475(7355):S8.
- Butterfield D.A., Castegna A., Draz J., Scapagnini G., Calabrese V. (2002). Vitamin E and neurodegenerative disorders associated with oxidative stress. *Nutr Neurosci*, 5, 229-39.
- Butterfield D.A., Pocernich C.B. (2003). The glutamatergic system and Alzheimer's disease: therapeutic implications. *CNS Drugs*, 17, 641-52.
- Cabib, S., 1993. Neurobiological basis of stereotypes. In: Lawrence, A.B., Rushen, J. (Eds.), *Stereotypic Animal Behaviour: Fundamentals and Applications to Welfare*. CAB International, Wallingford, pp. 119–146.
- Cao, C., Cirrito, J. R., Lin, X., Wang, L., Verges, D. K., Dickson, A., Potter, H. (2009). Caffeine suppresses amyloid-beta levels in plasma and brain of alzheimer's disease transgenic mice. *Journal of Alzheimer's Disease: JAD*, 17(3), 681-697.
- Carvalho, C., Correia, S. C., Santos, R. X., Cardoso, S., Moreira, P. I., Clark, T. A., Perry, G. (2009). Role of mitochondrial-mediated signaling pathways in Alzheimer disease and hypoxia. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 41(5), 433–40.
- Castañé, A., Theobald, D. E. H., & Robbins, T. W. (2010). Selective lesions of the dorsomedial striatum impair serial spatial reversal learning in rats. *Behavioural Brain Research*, 210(1), 74–83.
- Chang, L., Liu, X., Liu, J., Li, H., Yang, Y., Liu, J., ... Long, J. (2014). D-galactose induces a mitochondrial complex I deficiency in mouse skeletal muscle: potential benefits of nutrient combination in ameliorating muscle impairment. *Journal of Medicinal Food*, 17(3), 357–64.
- Chapillon P., manneché C., Belzung C., caston . (1999). rearing environmental enrichment in two indred strains of mice: 1. Effects on emotional reactivity. *Behav Genet*, 29, 41-6.
- Chapillon, P., Patin, V., Roy, V., Vincent, A., & Caston, J. (2002). Effects of pre- and postnatal stimulation on developmental, emotional, and cognitive aspects in rodents: A review. *Developmental Psychobiology*, 41(4), 373-387.
- Check, E. (2002). Nerve inflammation halts trial for Alzheimer's drug. *Nature*, 415(6871), 462.
- Chen, C. F., Lang, S. Y., Zuo, P. P., Yang, N., Wang, X. Q., & Xia, C. (2006). Effects of D-galactose on the expression of hippocampal peripheral-type benzodiazepine receptor and spatial memory performances in rats. *Psychoneuroendocrinology*, 31(7), 805–11.
- Chen, S. T., Siddarth, P., Ercoli, L. M., Merrill, D. A., Torres-Gil, F., & Small, G. W. (2014). Modifiable risk factors for Alzheimer disease and subjective memory impairment across age groups. *PloS One*, 9(6), e98630.

- Chishti MA, Yang DS, Janus C, Phinney AL, Horne P, Pearson J, et al. (2001). Early-onset amyloid deposition and cognitive deficits in transgenic mice expressing a double mutant form of amyloid precursor protein 695. *J Biol Chem*, 276:21562–70.
- Chiu, C.-C., Su, K.-P., Cheng, T.-C., Liu, H.-C., Chang, C.-J., Dewey, M. E., Huang, S.-Y. (2008). The effects of omega-3 fatty acids monotherapy in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: a preliminary randomized double-blind placebo-controlled study. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 32(6), 1538–44.
- Chiu, C.-S., Deng, J.-S., Hsieh, M.-T., Fan, M.-J., Lee, M.-M., Chueh, F.-S., Peng, W.-H. (2009). Yam (*Dioscorea pseudojaponica* Yamamoto) ameliorates cognition deficit and attenuates oxidative damage in senescent mice induced by D-galactose. *The American Journal of Chinese Medicine*, 37(5), 889–902.
- Chu, Y.-F., Chang, W.-H., Black, R. M., Liu, J.-R., Sompol, P., Chen, Y., Cheng, I. H. (2012). Crude caffeine reduces memory impairment and amyloid β (1-42) levels in an Alzheimer's mouse model. *Food Chemistry*, 135(3), 2095–102.
- Cleveland, D. W., Hwo, S. Y., & Kirschner, M. W. (1977). Purification of tau, a microtubule-associated protein that induces assembly of microtubules from purified tubulin. *J.Mol.Biol.*, 116, 207-225.
- Cole, L. J., Farrell, M. J., Duff, E. P., Barber, J. B., Egan, G. F., & Gibson, S. J. (2006). Pain sensitivity and fMRI pain-related brain activity in Alzheimer's disease. *Brain: A Journal of Neurology*, 129(Pt 11), 2957–65
- Collison, K. S., Makhoul, N. J., Zaidi, M. Z., Saleh, S. M., Andres, B., Inglis, A., Al-Mohanna, F. A. (2012). Gender dimorphism in aspartame-induced impairment of spatial cognition and insulin sensitivity. *PloS One*, 7(4), e31570
- Colorado, R. A., Shumake, J., Conejo, N. M., Gonzalez-Pardo, H., & Gonzalez-Lima, F. (2006). Effects of maternal separation, early handling, and standard facility rearing on orienting and impulsive behavior of adolescent rats. *Behavioural Processes*, 71(1), 51-58.
- Columba-Cabezas, S., Iaffaldano, G., Chiarotti, F., Alleva, E., & Cirulli, F. (2009). Early handling increases susceptibility to experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in C57BL/6 male mice. *Journal of Neuroimmunology*, 212(1–2), 10-16.
- Corona, C., Frazzini, V., Silvestri, E., Lattanzio, R., La Sorda, R., Piantelli, M., Sensi, S. L. (2011). Effects of dietary supplementation of carnosine on mitochondrial dysfunction, amyloid pathology, and cognitive deficits in 3xTg-AD mice. *PloS One*, 6(3), e17971.
- Costenla, A. R., Cunha, R. A., & de Mendonca, A. (2010). Caffeine, adenosine receptors, and synaptic plasticity. *Journal of Alzheimer's Disease : JAD*, 20 Suppl 1, S25-34

- Cotman, C.W. and Head, E. (2008) The canine (dog) model of human aging and disease: dietary, environmental and immunotherapy approaches. *J. Alzheimers Dis.* 15, 685–707
- Crooks V, Lubben J, Petitti D, Little D, Chiu V. (2008). Social network, cognitive function, and dementia incidence among elderly women. *Am J Public Health*, 98(7):1221–1227.
- Cui, X., Zuo, P., Zhang, Q., Li, X., Hu, Y., Long, J. Liu, J. (2006). Chronic systemic D-galactose exposure induces memory loss, neurodegeneration, and oxidative damage in mice: protective effects of R-alpha-lipoic acid. *Journal of Neuroscience Research*, 83(8), 1584–90.
- Cummings JL, Mega M, Gray K, Rosenberg-Thompson S, Carusi DA, Gornbein J. (1994). The Neuropsychiatric Inventory: comprehensive assessment of psychopathology in dementia. *Neurology*, 44(12):2308-14.
- Cunha R.A. (2008). Cafeína, receptores de adenosina, memoria y enfermedad de Alzheimer. *Med Clin*, 131, 790-795.
- Cunha, R. A., & Agostinho, P. M. (2010). Chronic caffeine consumption prevents memory disturbance in different animal models of memory decline. *Journal of Alzheimer's Disease : JAD*, 20 Suppl 1, S95-116.
- Cupino, T. L., & Zabel, M. K. (2014). Alzheimer's silent partner: cerebral amyloid angiopathy. *Translational Stroke Research*, 5(3), 330–7.
- Cuthbert, P. C., Stanford, L. E., Coba, M. P., Ainge, J. A., Fink, A. E., Opazo, P., Grant, S. G. N. (2007). Synapse-associated protein 102/dlgh3 couples the NMDA receptor to specific plasticity pathways and learning strategies. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 27(10), 2673–82.
- Daffner, K. R. (2010). Promoting successful cognitive aging: a comprehensive review. *Journal of Alzheimer's Disease : JAD*, 19(4), 1101–22.
- Daly J.W., Fredholm B.B. (1988). Caffeine – an atypical drug of dependence. *Drug Alcohol Depend*, 51, 199-206.
- De Marco, M., Shanks, M. F., & Venneri, A. (2014). Cognitive stimulation: the evidence base for its application in neurodegenerative disease. *Current Alzheimer Research*, 11(5), 469–83.
- Deane, R., Wu, Z., & Zlokovic, B. V. (2004). RAGE (yin) versus LRP (yang) balance regulates alzheimer amyloid beta-peptide clearance through transport across the blood-brain barrier. *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation*, 35(11 Suppl 1), 2628–31.
- Dodart JC, Meziane H, Mathis C, et al. (1999a). Behavioral disturbances in transgenic mice overexpressing the V717F beta-amyloid precursor protein. *Behav Neurosci*, 113:982-90.

- Dodart JC, Mathis C, Bales KR, et al. (1999b). Early regional cerebral glucose hypometabolism in transgenic mice overexpressing the V717F β -amyloid precursor protein. *Neurosci Lett*, 277:49-52.
- Donato, F., Rompani, S. B., & Caroni, P. (2013). Parvalbumin-expressing basket-cell network plasticity induced by experience regulates adult learning. *Nature*, 504(7479), 272–6.
- Duff K, Eckman C, Zehr C, et al. (1996). Increased amyloid- β 42(43) in brains of mice expressing mutant presenilin 1. *Nature*, 383:710-3.
- Durand, M., Sarrieu, a, Aguerre, S., Mormède, P., & Chaouloff, F. (1998). Differential effects of neonatal handling on anxiety, corticosterone response to stress, and hippocampal glucocorticoid and serotonin (5-HT)_{2A} receptors in Lewis rats. *Psychoneuroendocrinology*, 23(4), 323–335.
- Duyckaerts, C., Potier, M.-C., & Delatour, B. (2008). Alzheimer disease models and human neuropathology: similarities and differences. *Acta Neuropathologica*, 115(1), 5–38.
- Ebert, U. and Kirch, W. (1998) Scopolamine model of dementia: electroencephalogram findings and cognitive performance. *Eur. J. Clin. Invest.* 28, 944–949.
- Ejsing, T. B., Hasselstrøm, J., & Linnet, K. (2006). The influence of P-glycoprotein on cerebral and hepatic concentrations of nortriptyline and its metabolites. *Drug Metabolism and Drug Interactions*, 21(3-4), 139–62.
- Elsawy, B., & Higgins, K. E. (2010). Physical activity guidelines for older adults. *American Family Physician*, 81(1), 55–9.
- Escorihuela R.M., Tobeña, A., Fernández-Teruel, A. (1994) L'estimulació infantil. Efectes de l'ambient i l'herència sobre l'emotivitat i l'aprenentatge. Bellaterra: Ciència i Tècnica, Medicina. (Ed) Serveis de publicacions de la UAB.
- Eskelinen, M. H., Ngandu, T., Helkala, E.-L., Tuomilehto, J., Nissinen, A., Soininen, H., & Kivipelto, M. (2008). Fat intake at midlife and cognitive impairment later in life: a population-based CAIDE study. *International Journal of Geriatric Psychiatry*, 23(7), 741–7.
- Eskelinen, M. H., Ngandu, T., Tuomilehto, J., Soininen, H., & Kivipelto, M. (2009). Midlife coffee and tea drinking and the risk of late-life dementia: a population-based CAIDE study. *Journal of Alzheimer's Disease : JAD*, 16(1), 85–91.
- España, J., Giménez-Llort, L., Valero, J., Miñano, A., Rábano, A., Rodríguez-Alvarez, J., Saura, C. A. (2010). Intraneuronal β -amyloid accumulation in the amygdala enhances fear and anxiety in alzheimer's disease transgenic mice. *Biological Psychiatry*, 67(6), 513-521.

Farlow, M., Anand, R., Messina, J., Hartman, R., & Veach, J. (2000). A 52-week study of the efficacy of rivastigmine in patients with mild to moderately severe Alzheimer's disease. *European Neurology*, 44(4), 236–41.

Fernández-Teruel, A., Escorihuela, R. M., Castellano, B., González, B., & Tobeña, A. (1997). Neonatal handling and environmental enrichment effects on emotionality, novelty/reward seeking, and age-related cognitive and hippocampal impairments: focus on the Roman rat lines. *Behavior Genetics*, 27(6), 513–26.

Fernández-Teruel, A., Giménez-Llort, L., Escorihuela, R. M., Gil, L., Aguilar, R., Steimer, T., et al. (2002). Early-life handling stimulation and environmental enrichment: Are some of their effects mediated by similar neural mechanisms? *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 73(1), 233–245.

Filali, M., Lalonde, R., Theriault, P., Julien, C., Calon, F., & Planel, E. (2012). Cognitive and non-cognitive behaviors in the triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease expressing mutated APP, PS1, and Mapt (3xTg-AD). *Behavioural Brain Research*, 234(2), 334–42.

Fillenbaum, G. G., Kuchibhatla, M. N., Hanlon, J. T., Artz, M. B., Pieper, C. F., Schmader, K. E., Gray, S. L. (2005). Dementia and Alzheimer's disease in community-dwelling elders taking vitamin C and/or vitamin E. *The Annals of Pharmacotherapy*, 39(12), 2009–14.

Ford, A. H. (2014). Neuropsychiatric symptoms of dementia: are pharmacological treatments effective and safe? *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*.

Franco, R., & Cedazo-Minguez, A. (2014). Successful therapies for Alzheimer's disease: why so many in animal models and none in humans? *Frontiers in Pharmacology*, 5, 146.

Frautschy SA, Yang F, Irizarry M, et al. (1998). Microglial response to amyloid plaques in APPsw transgenic mice. *Am J Pathol*, 152:307-17.

Frautschy, S. A., Hu, W., Kim, P., Miller, S. A., Chu, T., Harris-White, M. E., & Cole, G. M. (n.d.). Phenolic anti-inflammatory antioxidant reversal of Abeta-induced cognitive deficits and neuropathology. *Neurobiology of Aging*, 22(6), 993–1005.

Fredholm, B. Are methylxantine effects due to antagonism of endogenous adenosine? (1980). *Trends Sci*, 1: 129-132.

Fredholm, B. B., Battig, K., Holmen, J., Nehlig, A., & Zvartau, E. E. (1999). Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacological Reviews*, 51(1), 83-133.

Fredholm, B. B., IJzerman, A. P., Jacobson, K. A., Klotz, K. N., & Linden, J. (2001). International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and

classification of adenosine receptors. *Pharmacological Reviews*, 53(4), 527–52.

Fredholm, B. B. (2007). Adenosine, an endogenous distress signal, modulates tissue damage and repair. *Cell Death and Differentiation*, 14(7), 1315-1323.

Gahr, M., Nowak, D. A., Connemann, B. J., & Schönfeldt-Lecuona, C. (2013). Cerebral Amyloid Angiopathy--a disease with implications for neurology and psychiatry. *Brain Research*, 1519, 19–30.

Games D, Adams D, Alessandrini R, et al. (1995). Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F β -amyloid precursor protein. *Nature*, 373:523-7.

García-Alberca, J. M., Lara, J. P., Berthier, M. L., Cruz, B., Barbancho, M. Á., Green, C., & González-Barón, S. (2010). Can impairment in memory, language and executive functions predict neuropsychiatric symptoms in Alzheimer's disease (AD)? Findings from a cross-sectional study. *Archives of Gerontology and Geriatrics*, 52(3), 264–9.

García-Mesa, Y., Lopez-Ramos, J. C., Gimenez-Llort, L., Revilla, S., Guerra, R., Gruart, A., Sanfeliu, C. (2011). Physical exercise protects against alzheimer's disease in 3xTg-AD mice. *Journal of Alzheimer's Disease : JAD*, 24(3), 421-454.

García-Mesa, Y., Gimenez-Llort, L., Lopez, L. C., Venegas, C., Cristofol, R., Escames, G., Sanfeliu, C. (2012). Melatonin plus physical exercise are highly neuroprotective in the 3xTg-AD mouse. *Neurobiology of Aging*, 33(6), 1124.e13-1124.e29.

García-Mesa, Y., Pareja-Galeano, H., Bonet-Costa, V., Revilla, S., Gómez-Cabrera, M. C., Gambini, J., Sanfeliu, C. (2014). Physical exercise neuroprotects ovariectomized 3xTg-AD mice through BDNF mechanisms. *Psychoneuroendocrinology*, 45, 154–66.

Garner, J. P., & Mason, G. J. (2002). Evidence for a relationship between cage stereotypies and behavioural disinhibition in laboratory rodents. *Behavioural Brain Research*, 136(1), 83-92.

Gerlai, R. (2001). Behavioral tests of hippocampal function: simple paradigms complex problems. *Behavioural Brain Research*, 125(1-2), 269–77.

Giménez-Llort, L., Blázquez, G., Cañete, T; Rosa, R, Vivó M., Oddo S., Navarro X., LaFerla FM., Johansson, B., Tobeña, A., Fernández-Teruel A. (2006). Modeling neuropsychiatric symptoms of Alzheimer's disease dementia in 3xTg-AD mice. *Alzheimer's Disease: New Advances*, Iqbal K., Winblad B., Avila J. Medimond SRL, eds, Pianoro (BO), Italy, pp. 513-516.

Giménez-Llort, L., Martínez, E., & Ferré, S. (1997). Different effects of dopamine antagonists on spontaneous and NMDA-induced motor activity in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 56(3), 549-553.

Giménez-Llort, L., De Vera, N., & Martínez, E. (1998). Analysis of chemically-induced alterations of the motor activity in rats. *Neurotoxicology*, *19*(3), 371-379.

Giménez-Llort, L., Fernández-Teruel, A., Escorihuela, R. M., Fredholm, B. B., Tobena, A., Pekny, M., et al. (2002). Mice lacking the adenosine A1 receptor are anxious and aggressive, but are normal learners with reduced muscle strength and survival rate. *The European Journal of Neuroscience*, *16*(3), 547-550.

Giménez-Llort, L., Blázquez, G., Cañete, T., Johansson, B., Oddo, S., Tobeña, A., et al. (2007). Modeling behavioral and neuronal symptoms of Alzheimer's disease in mice: A role for intraneuronal amyloid. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *31*(1), 125-147.

Giménez-Llort, L., Arranz, L., Mate, I., & De la Fuente, M. (2008). Gender-specific neuroimmunoendocrine aging in a triple-transgenic 3xTg-AD mouse model for Alzheimer's disease and its relation with longevity. *Neuroimmunomodulation*, *15*(4-6), 331-343.

Giménez-Llort, L., García, Y., Buccieri, K., Revilla, S., Sunol, C., Cristofol, R., et al. (2010). Gender-specific neuroimmunoendocrine response to treadmill exercise in 3xTg-AD mice. *International Journal of Alzheimer's Disease*, *2010*, 128354.

Giménez-Llort, Lydia, Maté, 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. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1262*, 74-84.

Giménez-Llort, L., Rivera-Hernández, G., Marin-Argany, M., Sánchez-Quesada, J. L., & 97Villegas, S. (2013). Early intervention in the 3xTg-AD mice with an amyloid β -antibody fragment ameliorates first hallmarks of Alzheimer disease. *mAbs*, *5*(5), 665-77.

Giménez-Llort, L., Torres-Lista, V., & De la Fuente, M. (2014). Crosstalk between Behavior and Immune System During the Prodromal Stages of Alzheimer's Disease. *Current Pharmaceutical Design*, *20*(29), 4723-32.

Giorgi, O., Lecca, D., Piras, G., Driscoll, P., & Corda, M. G. (2003). Dissociation between mesocortical dopamine release and fear-related behaviours in two psychogenetically selected lines of rats that differ in coping strategies to aversive conditions. *The European Journal of Neuroscience*, *17*(12), 2716-2726.

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

Griffiths, R. R., Evans, S. M., Heishman, S. J., Preston, K. L., Sannerud, C. A., Wolf, B., & Woodson, P. P. (1990). Low-dose caffeine discrimination in

humans. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 252(3), 970–8.

Grootendorst, J., de Kloet, E. ., Dalm, S., & Oitzl, M. (2001). Reversal of cognitive deficit of apolipoprotein E knockout mice after repeated exposure to a common environmental experience. *Neuroscience*, 108(2), 237–247.

Gross, A. N., Richter, S. H., Engel, A. K. J., & Würbel, H. (2012). Cage-induced stereotypies, perseveration and the effects of environmental enrichment in laboratory mice. *Behavioral Brain Research*, 234(1), 61–68.

Gschanes, A., Eggenreich, U., Windisch, M., & Crailsheim, K. (1995). Effects of postnatal stimulation on the passive avoidance behaviour of young rats. *Behavioural Brain Research*, 70(2), 191–6.

Gu, X., Zhou, Y., Hu, X., Gu, Q., Wu, X., Cao, M., Liu, C. (2013). Reduced numbers of cortical GABA-immunoreactive neurons in the chronic D-galactose treatment model of brain aging. *Neuroscience Letters*, 549, 82–6.

Gu, Y., Nieves, J. W., Stern, Y., Luchsinger, J. A., & Scarmeas, N. (2010). Food combination and Alzheimer disease risk: a protective diet. *Archives of Neurology*, 67(6), 699–706.

Gulati, A., Srimal, R. C., & Dhawan, B. N. (1988). An analysis of stereotyped behaviour in *mastomys natalensis*. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 337(5), 572-575.

Gulinello, M., Gertner, M., Mendoza, G., Schoenfeld, B. P., Oddo, S., LaFerla, F., Faber, D. S. (2009). Validation of a 2-day water maze protocol in mice. *Behavioural Brain Research*, 196(2), 220–7.

Han, S.-H., & Mook-Jung, I. (2014). Diverse molecular targets for therapeutic strategies in Alzheimer's disease. *Journal of Korean Medical Science*, 29(7), 893–902.

Handwerker H.O., & Arendt-Nielsen (2013). *Pain Models: Translational Relevance and Applications*. 1. ed. Washington D.C.: International Association for the Study of Pain/IASP Press, 2013. p. 299-316.

Hao, L., Huang, H., Gao, J., Marshall, C., Chen, Y., & Xiao, M. (2014). The influence of gender, age and treatment time on brain oxidative stress and memory impairment induced by D-galactose in mice. *Neuroscience Letters*, 571, 45–9.

He, M., Zhao, L., Wei, M.-J., Yao, W.-F., Zhao, H.-S., & Chen, F.-J. (2009). Neuroprotective effects of (-)-epigallocatechin-3-gallate on aging mice induced by D-galactose. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 32(1), 55–60.

Herzig MC, Winkler DT, Burgermeister P, Pfeifer M, Kohler E, Schmidt SD, et al. (2004). Abeta is targeted to the vasculature in a mouse model of hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis. *Nat Neurosci*, 7:954–60.

Higdon, J. V., & Frei, B. (2006). Coffee and health: a review of recent human research. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46(2), 101–23.

Holcomb L, Gordon MN, McGowan E, et al. (1998). Accelerated Alzheimer-type phenotype in transgenic mice carrying both mutant amyloid precursor protein and presenilin 1 transgenes. *Nat Med*, 4:97-100.

Holmes, A., le Guisquet, A. M., Vogel, E., Millstein, R. A., Leman, S., & Belzung, C. (2005). Early life genetic, epigenetic and environmental factors shaping emotionality in rodents. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 29(8), 1335-1346.

Holtzman RE, Rebok GW, Saczynski JS, Kouzis AC, Wilcox Doyle K, Eaton WW. (2004). Social network characteristics and cognition in middle-aged and older adults. *J Gerontol B Psychol Sci Soc Sci.*, 59(6):P278–P284.

Hope, T., Keene, J., Gedling, K., Fairburn, C.G., Jacoby, R., (1998). Predictors of institutionalization for people with dementia living at home with a care. *International Journal of Geriatric Psychiatry*, 13,682–690.

Hsiao K, Chapman P, Nilsen S, et al. (1996). Correlative memory deficits, A β elevation and amyloid plaques in transgenic mice. *Science*, 274:99-102.

Hugues, C. Alzheimer's and other Dementias. (2011). Oxford University Press, New York, United States.

Irizarry MC, Soriano F, McNamara M, et al. (1997a). A β deposition is associated with neuropil changes, but not with overt neuronal loss in the PDAPP transgenic mice. *J Neurosci*, 17:7053-9.

Irizarry MC, McNamara M, Fedorchak K, et al. (1997b). APP-Sw transgenic mice develop age related amyloid deposits and neuropil abnormalities, but no neuronal loss in CA1. *J Neuropathol Exp Neurol*, 56:965-73.

Janus, C. (2004). Search strategies used by APP transgenic mice during navigation in the Morris water maze. *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 11(3), 337–46.

Jedrzenski, M. K., Ewbank, D. C., Wang, H., & Trojanowski, J. Q. (2014). The Impact of Exercise, Cognitive Activities, and Socialization on Cognitive Function: Results From the National Long-Term Care Survey. *American Journal of Alzheimer's Disease and Other Dementias*, 29(4), 372–378.

Johansson, B., Halldner, L., Dunwiddie, T. V, Masino, S. A., Poelchen, W., Giménez-Llort, L., Fredholm, B. B. (2001). Hyperalgesia, anxiety, and decreased hypoxic neuroprotection in mice lacking the adenosine A1 receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(16), 9407–12.

Kalaria, R. N. (2010). Vascular basis for brain degeneration: faltering controls and risk factors for dementia. *Nutrition Reviews*, 68 Suppl 2, S74–87.

- Kang, J. H., Cook, N., Manson, J., Buring, J. E., & Grodstein, F. (2006). A randomized trial of vitamin E supplementation and cognitive function in women. *Archives of Internal Medicine*, *166*(22), 2462–8.
- Karttunen, K., Karppi, P., Hiltunen, A., Vanhanen, M., Välimäki, T., Martikainen, J., Pirttilä, T. (2011). Neuropsychiatric symptoms and quality of life in patients with very mild and mild Alzheimer's disease. *International Journal of Geriatric Psychiatry*, *26*(5), 473–82.
- Kavanagh, S., Van Baelen, B., & Schäuble, B. (2011). Long-term effects of galantamine on cognitive function in Alzheimer's disease: a large-scale international retrospective study. *Journal of Alzheimer's Disease: JAD*, *27*(3), 521–30.
- Kilkenny, C., Browne, W. J., Cuthill, I. C., Emerson, M., & Altman, D. G. (2010). Improving bioscience research reporting: The ARRIVE guidelines for reporting animal research. *Journal of Pharmacology & Pharmacotherapeutics*, *1*(2), 94-99.
- Kitanaka, J., Kitanaka, N., Tatsuta, T., Miyoshi, A., Koumoto, A., Tanaka, K., et al. (2010). Pretreatment with l-histidine produces a shift from methamphetamine-induced stereotypical biting to persistent locomotion in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *94*(3), 464-470.
- Kitawaza 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*, 8843-53.
- Kitazawa, M., Vasilevko, V., Cribbs, D. H., & LaFerla, F. M. (2009). Immunization with amyloid-beta attenuates inclusion body myositis-like myopathology and motor impairment in a transgenic mouse model. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *29*(19), 6132–41.
- Kumar, A., Dogra, S., & Prakash, A. (2009). Effect of carvedilol on behavioral, mitochondrial dysfunction, and oxidative damage against D-galactose induced senescence in mice. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, *380*(5), 431–41.
- Kumar, A., Prakash, A., & Dogra, S. (2010). Naringin alleviates cognitive impairment, mitochondrial dysfunction and oxidative stress induced by D-galactose in mice. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, *48*(2), 626–32.
- Kuusisto, J., Koivisto, K., Kervinen, K., Mykkänen, L., Helkala, E. L., Vanhanen, M., Riekkinen, P. (1994). Association of apolipoprotein E phenotypes with late onset Alzheimer's disease: population based study. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, *309*(6955), 636–8.

- Lad HV, Liu L, Paya-Cano JL, Parsons MJ, Kember R, Fernandes C, Schalkwyk LC. Behavioural battery testing: evaluation and behavioural outcomes in 8 inbred mouse strains. *Physiol Behav* 2010;99:301–316.
- Lalonde, R., Dumont, M., Staufenbiel, M., Sturchler-Pierrat, C., & Strazielle, C. (2002). Spatial learning, exploration, anxiety, and motor coordination in female APP23 transgenic mice with the swedish mutation. *Brain Research, 956*(1), 36-44.
- Lalonde, R., Lewis T.L., Strazielle, C., Kim H., Fukuchi K. (2003a). Transgenic mice expressing the β APP695SWE mutation: effects on exploratory activity, anxiety, and motor coordination. *Brain Res.* 977, 38-45.
- Lalonde, R., Qian, S., & Strazielle, C. (2003b). Transgenic mice expressing the PS1-A246E mutation: Effects on spatial learning, exploration, anxiety, and motor coordination. *Behavioural Brain Research, 138*(1), 71-79.
- Lan, Z., Liu, J., Chen, L., Fu, Q., Luo, J., Qu, R., Ma, S. (2012). Danggui-Shaoyao-San ameliorates cognition deficits and attenuates oxidative stress-related neuronal apoptosis in d-galactose-induced senescent mice. *Journal of Ethnopharmacology, 141*(1), 386–395.
- Lang, U. E., Lang, F., Richter, K., Vallon, V., Lipp, H.-P., Schnermann, J., & Wolfer, D. P. (2003). Emotional instability but intact spatial cognition in adenosine receptor 1 knock out mice. *Behavioural Brain Research, 145*(1-2), 179–188.
- Larson J, Lynch G, Games D, Seubert P. (1999). Alterations in synaptic transmission and long-term potentiation in hippocampal slices from young and aged PDAPP mice. *Brain Res*, 840:23-35.
- Lazarov, O., Morfini, G. A., Pigino, G., Gadadhar, A., Chen, X., Robinson, J., Sisodia, S. S. (2007). Impairments in fast axonal transport and motor neuron deficits in transgenic mice expressing familial Alzheimer's disease-linked mutant presenilin 1. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience, 27*(26), 7011–20.
- Lei, H., Wang, B., Li, W.-P., Yang, Y., Zhou, A.-W., & Chen, M.-Z. (2003). Anti-aging effect of astragalosides and its mechanism of action. *Acta Pharmacologica Sinica, 24*(3), 230–4.
- Lei, M., Su, Y., Hua, X., Ding, J., Han, Q., Hu, G., & Xiao, M. (2008). Chronic systemic injection of D-galactose impairs the septohippocampal cholinergic system in rats. *Neuroreport, 19*(16), 1611–5.
- Levine, S., Chevalier, J.A., Korchin, S.J. (1956). The effects of early shock and handling on later avoidance conditioning. *Journal of personality, 24*, 475-493.
- Levine, S. (1957). Infantile experience and resistance to physiological stress. *Science, 126*(3770), 405.

- Levine, S. (1962). Plasma free corticosteroid response to electric shock in rats stimulated in infancy. *Science*, 135: 795-6.
- Levine, S. (1967). Maternal and environmental influences on the adrenocortical response to stress in weanling rats. *Science*, 156(3772), 258-60.
- Levine, S. (2000). Influence of psychological variables on the activity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *European Journal of Pharmacology*, 405(1-3), 149-160.
- Lewis J, McGowan E, Rockwood J, et al. (2000). Neurofibrillary tangles, amyotrophy and progressive motor disturbance in mice expressing mutant (P301L) tau protein. *Nat Genet*, 25:402-5.
- Lewis J, Dickson DW, Lin WL, et al. (2001). Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP. *Science*, 293:1487-91.
- Li, W., Wu, Y., Min, F., Li, Z., Huang, J., & Huang, R. (2010). A nonhuman primate model of Alzheimer's disease generated by intracranial injection of amyloid- β 42 and thiorphan. *Metabolic Brain Disease*, 25(3), 277-84.
- Li M, Y., & Dicks, D. W. (1997). Enhanced binding of advanced glycation endproducts (AGE) by the ApoE4 isoform links the mechanism of plaque deposition in Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters*, 226(3), 155-158.
- Littbrand, H., Stenvall, M., & Rosendahl, E. (2011). Applicability and effects of physical exercise on physical and cognitive functions and activities of daily living among people with dementia: a systematic review. *American Journal of Physical Medicine & Rehabilitation / Association of Academic Physiatrists*, 90(6), 495-518.
- Liu, M.G., & Chen, J. (2014). Preclinical research on pain comorbidity with affective disorders and cognitive deficits: Challenges and perspectives. *Progress in Neurobiology*, 116, 13-32.
- Livingston, G., Johnston, K., Katona, C., Paton, J., & Lyketsos, C. G. (2005). Systematic review of psychological approaches to the management of neuropsychiatric symptoms of dementia. *The American Journal of Psychiatry*, 162(11), 1996-2021.
- Lopez-Aumatell, R., Guitart-Masip, M., Vicens-Costa, E., Gimenez-Llort, L., Valdar, W., Johannesson, M., et al. (2008). Fearfulness in a large N/Nih genetically heterogeneous rat stock: Differential profiles of timidity and defensive flight in males and females. *Behavioral Brain Research*, 188(1), 41-55.
- Lu J, Zheng YL, Luo L, Wu DM, Sun DX, Feng YJ. (2006). Quercetin reverses D-galactose induced neurotoxicity in mouse brain. *Behav Brain Res*, 171:251-260.

- Lu, J., Zheng, Y.-L., Wu, D.-M., Luo, L., Sun, D.-X., & Shan, Q. (2007). Ursolic acid ameliorates cognition deficits and attenuates oxidative damage in the brain of senescent mice induced by D-galactose. *Biochemical Pharmacology*, 74(7), 1078–90.
- Lukas, A., Schuler, M., Fischer, T. W., Gibson, S. J., Savvas, S. M., Nikolaus, T., & Denking, M. (2012). Pain and dementia: a diagnostic challenge. *Zeitschrift Für Gerontologie Und Geriatrie*, 45(1), 45–9.
- Luo, Y., Niu, F., Sun, Z., Cao, W., Zhang, X., Guan, D., Xu, Y. (2009). Altered expression of Abeta metabolism-associated molecules from D-galactose/AlCl₃ induced mouse brain. *Mechanisms of Ageing and Development*, 130(4), 248–52.
- Ma, Q.-L., Yang, F., Rosario, E. R., Ubeda, O. J., Beech, W., Gant, D. J., Cole, G. M. (2009). Beta-amyloid oligomers induce phosphorylation of tau and inactivation of insulin receptor substrate via c-Jun N-terminal kinase signaling: suppression by omega-3 fatty acids and curcumin. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 29(28), 9078–89.
- Maeda, K., Tanimoto, K., Terada, T., Shintani, T., & Kakigi, T. (1991). Elevated urinary free cortisol in patients with dementia. *Neurobiology of Aging*, 12(2), 161-163.
- Mangialasche, F., Solomon, A., Winblad, B., Mecocci, P., & Kivipelto, M. (2010). Alzheimer's disease: clinical trials and drug development. *Lancet Neurology*, 9(7), 702–16.
- Marcolin, M. d. L., Benitz, A. d. N. D., Arcego, D. M., Noschang, C., Krolow, R., & Dalmaz, C. (2012). Effects of early life interventions and palatable diet on anxiety and on oxidative stress in young rats. *Physiology & Behavior*, 106(4), 491-498.
- Marques, S., Batalha, V. L., Lopes, L. V., & Outeiro, T. F. (2011). Modulating Alzheimer's disease through caffeine: a putative link to epigenetics. *Journal of Alzheimer's Disease: JAD*, 24 Suppl 2, 161–71.
- Martinez-Coria, H., Green, K. N., Billings, L. M., Kitazawa, M., Albrecht, M., Rammes, G., LaFerla, F. M. (2010). Memantine improves cognition and reduces Alzheimer's-like neuropathology in transgenic mice. *The American Journal of Pathology*, 176(2), 870–80.
- Mason, G. J. (1991). Stereotypes: a critical review. *Animal Behavior* 41, 1015–1037.
- Mattson MP. (2004) Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature* 430, 631-9.
- Meaney, M. J., Aitken, D. H., Bodnoff, S. R., Iny, L. J., Tatarewicz, J. E., & Sapolsky, R. M. (1985). Early postnatal handling alters glucocorticoid receptor

concentrations in selected brain regions. *Behavioral Neuroscience*, 99(4), 765–70.

Meaney, M. J., Aitken, D. H., van Berkel, C., Bhatnagar, S., & Sapolsky, R. M. (1988). Effect of neonatal handling on age-related impairments associated with the hippocampus. *Science (New York, N.Y.)*, 239(4841 Pt 1), 766–8.

Meaney, M. J., Mitchell, J. B., Aitken, D. H., Bhatnagar, S., Bodnoff, S. R., Iny, L. J., et al. (1991). The effects of neonatal handling on the development of the adrenocortical response to stress: Implications for neuropathology and cognitive deficits in later life. *Psychoneuroendocrinology*, 16(1-3), 85-103.

Meerlo, P., Horvath, K. M., Nagy, G. M., Bohus, B., & Koolhaas, J. M. (1999). The influence of postnatal handling on adult neuroendocrine and behavioural stress reactivity. *Journal of neuroendocrinology*, 11(12), 925–933.

Millstein, R., & Holmes, A. (2007). Effects of repeated maternal separation on anxiety- and depression-related phenotypes in different mouse strains. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 31(1), 3–17.

Mogil, J. S. (2009). Animal models of pain: progress and challenges. *Nature Reviews. Neuroscience*, 10(4), 283–94.

Monroe, T. B., Gore, J. C., Chen, L. M., Mion, L. C., & Cowan, R. L. (2012). Pain in people with Alzheimer disease: potential applications for psychophysical and neurophysiological research. *Journal of Geriatric Psychiatry and Neurology*, 25(4), 240–55.

Moro, V., Condoleo, M. T., Valbusa, V., Broggio, E., Moretto, G., & Gambina, G. (2014). Cognitive Stimulation of Executive Functions in Mild Cognitive Impairment: Specific Efficacy and Impact in Memory. *American Journal of Alzheimer's Disease and Other Dementias*.

Morris, M.C., Evans, D.A., Bienias, J.L., Tangney, C.C., Wilson, R.S. (2004). Dietary fat intake and 6-year cognitive change in an older biracial community population. *Neurology*, 62 1573-1579.

Moy, G. A., & McNay, E. C. (2013). Caffeine prevents weight gain and cognitive impairment caused by a high-fat diet while elevating hippocampal BDNF. *Physiology & Behavior*, 109, 69–74

Nakamura, S., Murayama, N., Noshita, T., Annoura, H., & Ohno, T. (2001). Progressive brain dysfunction following intracerebroventricular infusion of beta1–42-amyloid peptide. *Brain Research*, 912(2), 128–136.

Nehlig, A., Daval, J. L., & Debry, G. (1992). Caffeine and the central nervous system: mechanisms of action, biochemical, metabolic and psychostimulant effects. *Brain Research. Brain Research Reviews*, 17(2), 139–70.

Nithianantharajah L., Hannan A.J. (2006). Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system. *Nat rev Neurosci* 7,697-709.

Noristani, H. N., Verkhatsky, A., & Rodríguez, J. J. (2012). High tryptophan diet reduces CA1 intraneuronal β -amyloid in the triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Aging Cell*, *11*(5), 810–22.

Núñez, J. F., Ferré, P., Escorihuela, R. M., Tobeña, A., & Fernández-Teruel, A. (1996). Effects of postnatal handling of rats on emotional, HPA-axis, and prolactin reactivity to novelty and conflict. *Physiology & Behavior*, *60*(5), 1355–9.

Núñez, J. F., Ferré, P., García, E., Escorihuela, R. M., Fernández-Teruel, a, & Tobeña, a. (1995). Postnatal handling reduces emotionality ratings and accelerates two-way active avoidance in female rats. *Physiology & behavior*, *57*(5), 831–835.

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

Oddo S, Caccamo A, Kitazawa M, Tseng BP, LaFerla FM. (2003b). Amyloid deposition precedes tangle formation in a triple transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, *24*:1063-70.

Oddo S, Billings L, Kesslak JP, Cribbs DH, LaFerla FM. (2004). Abeta immunotherapy leads to clearance of early, but not late, hyperphosphorylated tau aggregates via the proteasome. *Neuron*, *43*:321-32.

Oddo, S., Caccamo, A., Green, K. N., Liang, K., Tran, L., Chen, Y., LaFerla, F. M. (2005). Chronic nicotine administration exacerbates tau pathology in a transgenic model of Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(8), 3046–51.

Organización Mundial de la Salud. Recomendaciones mundiales sobre actividad física para la salud. Ediciones de la OMS, 2010. Organización Mundial de la Salud, Ginebra, Suiza.

Oyama, F., Sawamura, N., Kobayashi, K., Morishima-Kawashima, M., Kuramochi, T., Ito, M., Ihara, Y. (1998). Mutant presenilin 2 transgenic mouse: effect on an age-dependent increase of amyloid beta-protein 42 in the brain. *Journal of Neurochemistry*, *71*(1), 313–22.

Pani, L., Porcella, A., & Gessa, G. L. (2000). The role of stress in the pathophysiology of the dopaminergic system. *Molecular Psychiatry*, *5*(1), 14-21.

Pappert, E. J., Goetz, C. G., Stebbins, G. T., Belden, M., & Carvey, P. M. (1998). 5-hydroxytryptophan-induced myoclonus in guinea pigs: Mediation through 5-HT1/2 receptor subtypes. *European Journal of Pharmacology*, *347*(1), 51-56.

Pappolla MA, Chyan YJ, Omar RA, et al. (1998). Evidence of oxidative stress and *in vivo* neurotoxicity of beta-amyloid in a transgenic mouse model of

Alzheimer's disease: a chronic oxidative paradigm for testing antioxidant therapies *in vivo*. *Am J Pathol*, 152:871-7.

Pappolla M. A., Bryant-Thomas T., Herbert D. *et al.* (2003) Mild hypercholesterolemia is an early risk factor for the development of Alzheimer amyloid pathology. *Neurology* 61, 199–205.

Parameshwaran, K., Irwin, M. H., Steliou, K., & Pinkert, C. a. (2010). D-galactose effectiveness in modeling aging and therapeutic antioxidant treatment in mice. *Rejuvenation research*, 13(6), 729–735.

Parfitt, D. B., Walton, J. R., Corriveau, E. a, & Helmreich, D. L. (2007). Early life stress effects on adult stress-induced corticosterone secretion and anxiety-like behavior in the C57BL/6 mouse are not as robust as initially thought. *Hormones and behavior*, 52(4), 417–426.

Paradies, G., Petrosillo, G., Pistolese, M., & Ruggiero, F. M. (2001). Reactive oxygen species generated by the mitochondrial respiratory chain affect the complex III activity via cardiolipin peroxidation in beef-heart submitochondrial particles. *Mitochondrion*, 1(2), 151–9.

Park, C. R. (2001). Cognitive effects of insulin in the central nervous system. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 25(4), 311–23.

Pautex, S., Michon, A., Guedira, M., Emond, H., Le Lous, P., Samaras, D., Gold, G. (2006). Pain in severe dementia: self-assessment or observational scales? *Journal of the American Geriatrics Society*, 54(7), 1040–5.

Pericak-Vance, M. A., & Haines, J. L. (2009). Beyond proof of principle: new genes for Alzheimer's disease through collaboration. *The Lancet. Neurology*, 8(11), 977–9.

Petersen RC, Smith GE, Ivnik RJ, Tangalos EG, Schaid DJ, Thibodeau SN, et al. (1995). Apolipoprotein E status as a predictor of the development of Alzheimer's disease in memory-impaired individuals. *JAMA*, 273(16):1274–8.

Petrosini L., De Bartolo P., Foti F., Gelgo F., Cutuli D., Leggio M.G., Mandolesi I. (2009). On whether the environmental enrichment may provide cognitive and brain reserves. *Brain Res Rev* 61,221-39.

Phillips, C., Baktir, M. A., Srivatsan, M., & Salehi, A. (2014). Neuroprotective effects of physical activity on the brain: a closer look at trophic factor signaling. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8, 170.

Piccininni, M., Di Carlo, A., Baldereschi, M., Zaccara, G., & Inzitari, D. (2005). Behavioral and psychological symptoms in Alzheimer's disease: Frequency and relationship with duration and severity of the disease. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*, 19(5-6), 276-281.

Pitchumoni, S. S., & Doraiswamy, P. M. (1998). Current status of antioxidant therapy for Alzheimer's Disease. *Journal of the American Geriatrics Society*, 46(12), 1566–72.

- Plotsky, P. M., & Meaney, M. J. (1993). Early, postnatal experience alters hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress-induced release in adult rats. *Brain Research. Molecular Brain Research*, 18(3), 195–200.
- Porsolt, R. D., Le Pichon, M., & Jalfre, M. (1977). Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature*, 266(5604), 730–2.
- Powell, S. B., Newman, H. A., McDonald, T. A., Bugenhagen, P., & Lewis, M. H. (2000). Development of spontaneous stereotyped behavior in deer mice: Effects of early and late exposure to a more complex environment. *Developmental Psychobiology*, 37(2), 100-108.
- Powell, S. B., Newman, H. A., Pendergast, J. F., & Lewis, M. H. (1999). A rodent model of spontaneous stereotypy: Initial characterization of developmental, environmental, and neurobiological factors. *Physiology & Behavior*, 66(2), 355-363.
- Presti, M. F., Gibney, B. C., & Lewis, M. H. (2004). Effects of intrastriatal administration of selective dopaminergic ligands on spontaneous stereotypy in mice. *Physiology & Behavior*, 80(4), 433-439.
- Prisila Dulcy, C., Singh, H. K., Preethi, J., & Emmanuvel Rajan, K. (2012). Standardized extract of *Bacopa monniera* (BESEB CDRI-08) attenuates contextual associative learning deficits in the aging rat's brain induced by D-galactose. *Journal of neuroscience research*, 90(10), 2053–64.
- Pryce, C. R., & Feldon, J. (2003). Long-term neurobehavioural impact of the postnatal environment in rats: manipulations, effects and mediating mechanisms. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 27(1-2), 57–71.
- Puglielli L., Tanzi R.E., kovacs D.M. (2003). Alzheimer's disease: the cholesterol connection. *Nat Neurosci* 6, 345-51.
- Puzzo, D., Lee, L., Palmeri, A., Calabrese, G., & Arancio, O. (2014). Behavioral assays with mouse models of Alzheimer's disease: practical considerations and guidelines. *Biochemical Pharmacology*, 88(4), 450–67.
- Quintanilla, R. A., & Johnson, G. V. W. (2009). Role of mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of Huntington's disease. *Brain Research Bulletin*, 80(4-5), 242–7.
- Ramakers IH, Visser PJ, Aalten P, Bekers O, Slegers K, van Broeckhoven CL, et al. (2008). The association between APOE genotype and memory dysfunction in subjects with mild cognitive impairment is related to age and Alzheimer pathology. *Dement Geriatr Cognit Disord*, 26(2):101–8.
- Randrup, A., Sorensen, G., & Kobayashi, M. (1988). Stereotyped behavior in animals induced by stimulant drugs or by a restricted cage environment: Relation to disintegrated behavior, brain dopamine and psychiatric disease. *Yakubutsu, Seishin, Kodo = Japanese Journal of Psychopharmacology*, 8(2), 313-327.

- Raskind, M., Kumar, V., Malaty, L., Messina, J., Hartman, R., & Anand, R. (2000). Rivastigmine for Alzheimer's Disease: Improvement Versus Reduced Worsening. *Primary Care Companion to the Journal of Clinical Psychiatry*, 2(4), 134–138.
- Reisberg, B., Borenstein, J., Salob, S. P., Ferris, S. H., Franssen, E., & Georgotas, A. (1987). Behavioral symptoms in Alzheimer's disease: phenomenology and treatment. *The Journal of Clinical Psychiatry*, 48 Suppl, 9–15.
- Reisberg, B., Doody, R., Stöffler, A., Schmitt, F., Ferris, S., & Möbius, H. J. (2003). Memantine in moderate-to-severe Alzheimer's disease. *The New England Journal of Medicine*, 348(14), 1333–41.
- Rivera-Oliver, M., & Díaz-Ríos, M. (2014). Using caffeine and other adenosine receptor antagonists and agonists as therapeutic tools against neurodegenerative diseases: a review. *Life Sciences*, 101(1-2), 1–9.
- Rogers, S. L., & Friedhoff, L. T. (1996). The efficacy and safety of donepezil in patients with Alzheimer's disease: results of a US Multicentre, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. The Donepezil Study Group. *Dementia (Basel, Switzerland)*, 7(6), 293–303.
- Ronnback A, Zhu S, Dillner K, Aoki M, Lilius L, Naslund J, et al. (2011). Progressive neuropathology and cognitive decline in a single arctic APP transgenic mouse model. *Neurobiol Aging*,32:280–92.
- Rosario, E. R., Carroll, J. C., & Pike, C. J. (2012). Evaluation of the effects of testosterone and luteinizing hormone on regulation of β -amyloid in male 3xTg-AD mice. *Brain Research*, 1466, 137–45.
- Roy, V., & Chapillon, P. (2002). The positive effects of postnatal handling on defensive burying are more obvious in a situation that enlarges the potential coping responses. *Behavioural Brain Research*, 136(1), 67–73.
- Roy, V., & Chapillon, P. (2004). Further evidences that risk assessment and object exploration behaviours are useful to evaluate emotional reactivity in rodents. *Behavioural Brain Research*, 154(2), 439-448.
- Sapolyk, R.M., Krey, L.C., McEwen, B.S. (1986). The neuroendocrinology of stress and aging: the glucocorticoid cascade hypothesis. *Endocrine Review* 75, 284–301.
- Sasaki M, Kodama C, Hidaka S, Yamashita F, Kinoshita T, Nemoto K, et al. (2009). Prevalence of four subtypes of mild cognitive impairment and APOE in a Japanese community. *Int J Geriatr Psychiatry* 24(10):1119–26.
- Scarmeas N., Stern Y., Mayeux R., Luchsinger J.A. (2006). Mediterranean diet, Alzheimer's disease, and vascular mediation. *Arch Neurol* 63, 1709-17.

Scarmeas, N., Luchsinger, J.A., Schupf, N., Brickman, A.M., Cosentino, S., Tang, M.X., et al. (2009). Physical activity, diet, and risk of Alzheimer disease. *JAMA*, 302(6):627–37.

Scarmeas, N., Luchsinger, J. A., Schupf, N., Brickman, A. M., Cosentino, S., Tang, M. X., & Stern, Y. (2009). Physical activity, diet, and risk of Alzheimer disease. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, 302(6), 627–37.

Scarpini, E., Scheltens, P., & Feldman, H. (2003). Treatment of Alzheimer's disease: current status and new perspectives. *The Lancet. Neurology*, 2(9), 539–47.

Schenk D, Barbour R, Dunn W, et al. (1999). Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature*, 400:173-7.

Scherder E.J.A., Bouma A., Borkent M., Rahman O. (1999). Alzheimer patients report less pain intensity and pain affect than non-demented elderly. *Psychiatry* 62, 265–72.

Scherder E.J.A., Bouma A. (2000). Visual analogue scales for pain assessment in Alzheimer's disease. *Gerontology* 46, 47–53.

Scherder E.J.A., Bouma A., Slaets J., et al. (2001). Repeated pain assessment in Alzheimer's Disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* 12, 400–07.

Scherder E.J.A., Slaets J., Deijen J.B., et al. (2003). Pain assessment in patients with possible vascular dementia. *Psychiatry* 66, 133–45.

Schmidt, R., Bach, M., Dal-Bianco, P., Holzer, P., Pluta-Fuerst, A., Assem-Hilger, E., Likar, R. (2010). Dementia and pain. *Neuropsychiatry: Clinic Diagnostic, Therapy and Rehabilitation*, 24(1), 1–13.

Shan Q, Lu J, Zheng Y, Li J, Zhou Z, Hu B, Zhang Z, Fan S, Mao Z, Wang Y, Ma D. (2009). Purple sweet potato color ameliorates cognition deficits and attenuates oxidative damage and inflammation in aging mouse brain induced by D-galactose. *J Biomed Biotechnol*, 564737.

Shimabukuro, J., Awata, S., & Matsuoka, H. (2005). Behavioral and psychological symptoms of dementia characteristic of mild alzheimer patients. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*, 59(3), 274-279.

Shukitt-Hale, B., Mouzakis, G., & Joseph, J. A. (1998). Psychomotor and spatial memory performance in aging male Fischer 344 rats. *Experimental Gerontology*, 33(6), 615–24.

Silverman, K., Mumford, G. K., & Griffiths, R. R. (1994). Enhancing caffeine reinforcement by behavioral requirements following drug ingestion. *Psychopharmacology*, 114(3), 424–32.

- Smith MA, Hirai K, Hsiao K, et al. (1998). Amyloid-beta deposition in Alzheimer transgenic mice is associated with oxidative stress. *J Neurochem*, 70:2212-5.
- Solfrizzi V., Colacicco A.M., D'Introno A., Capurso C., Torres F., Rizzo C., Capurso A., Panza F. (2006). Dietary intake of unsaturated fatty acids and age-related cognitive decline: a 8.5-year follow-up of the Italian Longitudinal Study on Aging. *Neurobiol Aging* 27, 1694-704.
- Solfrizzi, V., Capurso, C., D'Introno, A., Colacicco, A. M., Santamato, A., Ranieri, M., Panza, F. (2008). Lifestyle-related factors in predementia and dementia syndromes. *Expert Review of Neurotherapeutics*, 8(1), 133–58.
- Song X, Bao MM, Li DD, Li YM. (1999). Advanced glycation in D-galactose induced mouse aging model. *Mech Ageing Dev*, 108:239–251.
- Steimer, T., Escorihuela, R. M., Fernández-Teruel, A., & Driscoll, P. (1998). Long-term behavioural and neuroendocrine changes in Roman high-(RHA/Verh) and low-(RLA-Verh) avoidance rats following neonatal handling. *International Journal of Developmental Neuroscience: The Official Journal of the International Society for Developmental Neuroscience*, 16(3-4), 165–74.
- Steinberg, M., Corcoran, C., Tschanz, J. T., Huber, C., Welsh-Bohmer, K., Norton, M. C., Lyketsos, C. G. (2006). Risk factors for neuropsychiatric symptoms in dementia: the Cache County Study. *International Journal of Geriatric Psychiatry*, 21(9), 824–30.
- Sternberg, W. F., & Ridgway, C. G. (2003). Effects of gestational stress and neonatal handling on pain, analgesia, and stress behavior of adult mice. *Physiology & Behavior*, 78(3), 375-383.
- Steward K., Bayne k. (2004). Environmental enrichment for laboratory animals. Inn: Reuter JD, editor. Laboratory animal medicine and management. New York: International veterinary information service; 2004.
- Sturchler-Pierrat C, Abramowski D, Duke M, et al. (1997). Two amyloid precursor protein transgenic mouse models with Alzheimer disease-like pathology. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94:13287-92.
- Tan, L.L., Wong, H.B., Allen, H. (2005). The impact of neuropsychiatric symptoms of dementia on distress in family and professional caregivers in Singapore. *International Psychoger*. 17, 253–263.
- Tian, Y., Zou, B., Yang, L., Xu, S.-F., Yang, J., Yao, P., & Li, C.-M. (2011). High molecular weight persimmon tannin ameliorates cognition deficits and attenuates oxidative damage in senescent mice induced by D-galactose. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 49(8), 1728–1736.
- Tikhonova, M. A., Yu, C.-H., Kolosova, N. G., Gerlinskaya, L. A., Maslennikova, S. O., Yudina, A. V, Ho, Y.J. (2014). Comparison of behavioral and biochemical deficits in rats with hereditary defined or D-

galactose-induced accelerated senescence: evaluating the protective effects of diosgenin. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 120, 7–16.

Torres-Lista, V., & Giménez-Llort, L. (2013). Impairment of nesting behaviour in 3xTg-AD mice. *Behavioural Brain Research*, 247(0), 153-157.

Touma, C., Ambrée, O., Görtz, N., Keyvani, K., Lewejohann, L., Palme, R., Sachser, N. (2004). Age- and sex-dependent development of adrenocortical hyperactivity in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 25(7), 893-904.

Van Dam, D., & De Deyn, P. P. (2011). Animal models in the drug discovery pipeline for Alzheimer's disease. *British Journal of Pharmacology*, 164(4), 1285–300.

Van Swearingen, A. E., Walker, Q. D., & Kuhn, C. M. (2012). Sex differences in novelty- and psychostimulant-induced behaviors of C57BL/6 mice. *Psychopharmacology*,

Vlassara, H., Bucala, R., & Striker, L. (1994). Pathogenic effects of advanced glycosylation: biochemical, biologic, and clinical implications for diabetes and aging. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 70(2), 138–51.

Vokó Z., Hollander M., Hofman A., Koudstaal P.J., Breteler M.M. (2003). Dietary antioxidants and the risk of ischemic stroke: the Rotterdam Study. *Neurology* 61, 1273-5.

von Holst, D. (1998). The concept of stress and its relevance for animal behavior. *Advanced Study Behavior* 27, 1–131.

Wakshlak, A., & Weinstock, M. (1990). Neonatal handling reverses behavioral abnormalities induced in rats by prenatal stress. *Physiology & Behavior*, 48(2), 289-292.

Wallace JE, Krauter EE, Campbell BA. (1980). Motor and reflexive behavior in the aging rat. *J Gerontol*, 35:364–370.

Wei HF, Li L, Song QJ, Ai HX, Chu J, Li W. (2005). Behavioral study of the D-galactose induced aging model in C57BL/6J mice. *Behav Brain Res*, 157:245–251.

Wilcock, G., Howe, I., Coles, H., Lilienfeld, S., Truyen, L., Zhu, Y., Kershaw, P. (2003). A long-term comparison of galantamine and donepezil in the treatment of Alzheimer's disease. *Drugs & Aging*, 20(10), 777–89.

Winklhofer, K. F., & Haass, C. (2010). Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1802(1), 29–44.

Wirhth, O., Weis, J., Szczygielski, J., Multhaup, G., & Bayer, T. A. (2006). Axonopathy in an APP/PS1 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica*, 111(4), 312–9.

- Wood, W. G., Li, L., Müller, W. E., & Eckert, G. P. (2014). Cholesterol as a causative factor in Alzheimer's disease: a debatable hypothesis. *Journal of Neurochemistry*, 129(4), 559–72.
- Wolozin B., Kellman W., Ruosseau P., Celesia G.G., Siegel G. (2000). Decreased prevalence of Alzheimer disease associated with 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Arch Neurol* 57, 1439-43.
- Xu XH, Zhao TQ. (2002). Effects of puerarin on D-galactose-induced memory deficits in mice. *Acta Pharmacol Sin*, 23:587–590.
- Yanar, K., Aydın, S., Cakatay, U., Mengi, M., Buyukpınarbaşılı, N., Atukeren, P., Uslu, E. (2011). Protein and DNA oxidation in different anatomic regions of rat brain in a mimetic ageing model. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, 109(6), 423–33.
- Yehuda S., Rabinovitz S., Carasso R.L., Mostofsky D.I. (2002). The role of polyunsaturated fatty acids in restoring the aging neuronal membrane. *J Neurobiol Aging*. 23, 843-53.
- Yoo, D. Y., Kim, W., Lee, C. H., Shin, B. N., Nam, S. M., Choi, J. H., Hwang, I. K. (2012). Melatonin improves D -galactose-induced aging effects on behavior , neurogenesis , and lipid peroxidation in the mouse dentate gyrus via increasing pCREB expression. *Journal of Pineal Research*, 52(1), 21–28.
- Zeitlin, R., Patel, S., Burgess, S., Arendash, G. W., & Echeverria, V. (2011). Caffeine induces beneficial changes in PKA signaling and JNK and ERK activities in the striatum and cortex of Alzheimer's transgenic mice. *Brain Research*, 1417, 127–36.
- Zhang X., Zhang, Z.B., Yang, X.P., Li, L., Gao., W.L. (1996). Disturbance of operational memory retention and retrieval in rats induced by D-galactose. *Chin J Appl Physiol*, 12:377-9.
- Zhang, Q., Li, X., Cui, X., & Zuo, P. (2005). D-galactose injured neurogenesis in the hippocampus of adult mice. *Neurological Research*, 27(5), 552–6.
- Zhang, X. L., Jiang, B., Li, Z. B., Hao, S., & An, L. J. (2007). Catalpol ameliorates cognition deficits and attenuates oxidative damage in the brain of senescent mice induced by D-galactose. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 88(1), 64–72.
- Zhang, X.-L., An, L.-J., Bao, Y.-M., Wang, J.-Y., & Jiang, B. (2008). d-galactose administration induces memory loss and energy metabolism disturbance in mice: protective effects of catalpol. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 46(8), 2888–94.
- Zhao, H., Niu, Q., Li, X., Liu, T., Xu, Y., Han, H., Wang, Z. (2012). Long-term resveratrol consumption protects ovariectomized rats chronically treated with D-galactose from developing memory decline without effects on the uterus. *Brain Research*, 1467, 67–80.

Zhou, Y., Dong, Y., Xu, Q., He, Y., Tian, S., Zhu, S., Dong, X. (2013). Mussel oligopeptides ameliorate cognition deficit and attenuate brain senescence in D-galactose-induced aging mice. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 59, 412–20.

Zuidema, S. U., de Jonghe, J. F. M., Verhey, F. R. J., & Koopmans, R. T. C. M. (2009). Predictors of neuropsychiatric symptoms in nursing home patients: influence of gender and dementia severity. *International Journal of Geriatric Psychiatry*, 24(10), 1079–86.

Annexos

11. Annexos

Annex 1. Article científic corresponent a l'Estudi I. Baeta-Corral, R., & Giménez-Llort, L. (2014). Bizarre behaviors and risk assessment in 3xTg-AD mice at early stages of the disease. *Behavioural Brain Research* 258, 97-105.

Annex 2. Manuscrit sotmès a la revista *Behavioral Neuroscience* amb data del 9 de juliol de 2014. En aquests moments es troba en fase d'avaluació de la resposta als referees enviada el 6 de setembre de 2014. "Baeta-Corral, R., and Giménez-Llort, L. (2014). Persistent hyperactivity and distinctive strategy features in the Morris Water Maze in 3xTg-AD mice at advanced stages of disease"

Annex 3. Pòster dels resultats preliminars sobre dolor en els ratolins 3xTg-AD. Baeta-Corral, R., Pick, C.G. & Giménez-Llort, L. (2014) Progression of BPSD-like symptoms and pain perception in aging and Alzheimer's disease: studies in 3xTg-AD mice. 6th International Conference on Pain and Impaired Cognition. Aalborg, Denmark.



Research report

Bizarre behaviors and risk assessment in 3xTg-AD mice at early stages of the disease



R. Baeta-Corral^{a,b}, L. Giménez-Llort^{a,b,*}

^a Institute of Neuroscience, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain

^b Department of Psychiatry and Forensic Medicine, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain

HIGHLIGHTS

- Bizarre behaviors in 3xTg-AD mice were conspicuous and measurable early-BPSD.
- They consisted in stereotyped-rearing and stretching, backward movements and jumps.
- Female gender was the most suitable to study bizarre movements and risk assessment.
- Handling reduced bizarre behaviors and freezing whereas potentiated risk assessment.
- Besides, handling induced selective effects on locomotor activity and emotionality.

ARTICLE INFO

Article history:
Received 7 October 2013
Accepted 10 October 2013
Available online 19 October 2013

Keywords:
Bizarre behavior
Risk assessment
3xTg-AD
Gender
Age
Environmental factor

ABSTRACT

Bizarre behaviors (stereotyped stretching, stereotyped rearing, backward movements and jumps) were conspicuously elicited in classical unconditioned tests with different levels of anxiogenic conditions. They were characterized for the first time as early-BPSD-like symptoms in 6 month-old male and female 3xTg-AD mice. The pattern of these behaviors differed from that exhibited by their age- and gender-matched NTg counterparts. Confrontation of an open and illuminated field was the best trigger of such behaviors as compared to mild neophobia in the corner test or the choice between two compartments in the dark-light box. Here we also report that increased freezing, delayed thigmotaxis and enhancement of emotional behaviors were early BPSD-like symptoms indicative of their response to low-stressful environments. Independently of the genotype, consistent gender effects pointed toward the relevance of female gender to study bizarre behaviors and risk assessment. The identification of items of behavior and its gender component were relevant to find out bidirectional and selective behavioral long-lasting effects of postnatal handling. This early life treatment reduced freezing and most of the bizarre behaviors whereas potentiated risk assessment and the horizontal locomotor activity. In contrast, vertical exploratory activity was not modified by the treatment. The results also talk in favor of the beneficence of early-life interventions on the behavioral outcome in adulthood in both healthy and disease conditions. As shown, the consideration of bizarre behaviors and risk assessment may become an additional tool for evaluating BPSD-like symptoms in relation to preventive and/or therapeutic strategies targeted at AD. It may also have a role in the evaluation of the potential risk factors for the disease.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Clinical manifestations of Alzheimer's disease (AD) are complex and heterogeneous, since they are not just restricted to the progressive loss of learning and memory [1]. Loss of judgment and executive functions together with the appearance of a wide array

of behavioral and psychological symptoms of dementia [BPSD] are also considered a strong source of distress and burden for the patients and caregivers [2,3]. Apathy, dysphoria, anxiety, stereotypes and other aberrant movements are the most frequently reported BPSD which are present since mild degrees of dementia and show a clear trend toward increasing their frequency with the progress of the disease [4]. Actually, growing number of studies assessing AD preventive and/or therapeutic strategies are not restricted to their mnemonic effects but also look for benefits on these other symptoms [1,5–7]. At the preclinical level, behavioral screening has confronted the difficulty of modeling this clinical heterogeneity in experimental animals [1]. Neophobia, seizures, increased aggression and locomotor activity are examples of the

* Corresponding author at: Unitat de Psicologia Mèdica, Departament de Psiquiatria i Medicina Legal, Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Campus Bellaterra, Edifici M, s/n 08193 Bellaterra, Spain. Tel.: +34 93 581 2378; fax: +34 93 581 1435.

E-mail address: lidia.gimenez@uab.cat (L. Giménez-Llort).

BPSD that have already been reproduced in various models of transgenic mice for AD (see i.e. [8]) while others are still poorly reported in the literature [9]. This is the case of stereotypes and other aberrant movements. In spite of the burden these bizarre behaviors cause in AD patients they have been scarcely addressed in the animal models [1]. These behaviors are disregarded in most of the behavioral screenings because of their low incidence and short duration as well as the specificity of experimental conditions where these behaviors become quantifiable [1].

Bizarre behaviors are mostly related to psychiatric and neurological disorders and at the experimental level they can be induced pharmacologically, after lesions of the central nervous system or derived from mutations [10,11]. Spontaneously, these behaviors have been reported to happen in bank voles [12], deer mice [13] and some strains of standard laboratory mice when housed in restricted environmental conditions [14,15]. In our laboratory, we have observed that these bizarre behaviors may be also elicited when the animals are submitted to unfamiliar environments, mostly those used for behavioral assessment of anxiety, suggesting that in those conditions they may be related to the animal's coping with stress strategies. A preliminary study indicated that at 6 months of age the incidence and duration of these behaviors in non-transgenic (NTg) mice were conspicuous enough to measurable levels. In the triple-transgenic 3xTg-AD mice for AD [16] these behaviors were enhanced. Interestingly, at the neuropathological level, the age of 6 months corresponds to the early stages of the disease when intraneuronal β A is detected in anxiety-related areas of the brain [17]. Therefore, this age provided an interesting behavioral scenario to characterize stereotyped and other aberrant behaviors in both 3xTg-AD mice and in its NTg strain. In this context, we also studied if they can benefit from preventive strategies such as postnatal handling (PH), a tactile sensory stimulation administered during the ontogeny, known to exert long-term positive effects on stress-related behavioral profiles [18–22]. Finally, due to the relevance of gender in the progress of the disease, this factor was also considered [23,24]. Besides, recent reports from our and other laboratories indicate that handling may exert its effects in a gender-dependent manner [5,21,25–27].

2. Material and methods

2.1. Animals

Triple-transgenic 3xTg-AD mice harboring PS1^{M146V}, APP^{Swe} and tau^{P301L} transgenes were genetically engineered at the University of California Irvine, as previously described [11]. Briefly, two independent transgenes (encoding human APP^{Swe} and human tau^{P301L}, both under control of the mouse Thy1.2 regulatory element) were co-injected into single-cell embryos harvested from homozygous mutant PS1^{M146V} knock-in (PS1KI) mice. The PS1 knock-in mice were originally generated as a hybrid C57BL/6 × 129.

20 male and 21 female 3xTg-AD mice and 18 male and 18 female C57BL/6 × 129 mice from a breeding program that was established in our laboratory at the Medical Psychology Unit, Universitat Autònoma de Barcelona, were used in this study. All the animals were housed and maintained (Makrolon, 35 cm × 35 cm × 25 cm) under standard laboratory conditions (12 h light:dark cycle starting at 8:00 h, food and water available *ad libitum*, 22 ± 2 °C, 50–60% humidity). The experiments were performed from 9:00 h to 13:00 h in accordance with 86/609/EEC regarding the care and use of animals for experimental procedures. The study comply with the ARRIVE guidelines developed by the NC3Rs [28].

2.2. Postnatal handling and experimental design

The 77 experimental subjects came from 30 litters with 6–8 pups. Litters were randomly distributed to the 4 experimental groups per gender: handled (15 litters) and non-handled animals (15 litters). Therefore, the final experimental design consisted in the following groups for each genotype: non-handled males, non-handled females, handling males and handling females ($n=9-11$, in each experimental group).

Postnatal handling (PH) procedure consisted of removing the pups from their mother and placing them individually in plastic compartments lined with paper towels. During the session, animals were softly handled and received 4 tactile stimulations on their back. This process was repeated 3 times every 5 min, twice a day from postnatal day 1 to 21. In the control groups the pups were left undisturbed except for weekly cage cleaning.

2.3. Behavioral assessments

At 6 months of age, the long lasting effects of the PH treatment were behaviorally assessed in a battery of classical unconditioned tests measuring exploratory activity and anxiety-like behaviors: the corner, the open field and the dark-light box tests [5].

2.3.1. Day 1. Corner test (CT) and open field test (OF)

Neophobia was evaluated in the CT for 30 s. Animals were individually placed in the center of a clean standard home cage, filled with wood shave bedding. Number of corners visited, latency to realize the first rearing, and the number of rearings were recorded.

Immediately after the CT, mice were placed in the center of an open field (homemade woodwork, white box, 55 cm × 55 cm × 25 cm) and observed for 5 min. The temporal measure of the following sequence of behavioral events was recorded: duration of freezing behavior, latency to leave the central square and that of entering the peripheral ring as well as latency and total duration of self-grooming behavior. Horizontal (crossings of 5 × 5 squares) and vertical (rearings with a wall support) locomotor activities were also measured.

In order to characterize the bizarre behaviors we had observed in this test, in the present work two distinctive motor features were taken under consideration: (1) Stereotyped or not, and (2) Horizontal or vertical activity. According to this criteria, the check list for bizarre behaviors resulted in:

Stereotyped stretching: repetitive head and/or body stretching that implies a 360° spatial horizontal rotation.

Stereotyped rearing: repetitive vertical rearing activity without wall support.

Backward movements: backward locomotion *Jumping*: vertical jump.

During the tests, defecation boli and urination were also recorded.

2.3.2. Day 5. Dark-light box test (DLB)

The DLB (Panlab, S.L., Barcelona, Spain) consists of a two-compartment box (black and dark, 27 cm × 18 cm × 27 cm; white and illuminated 20 W, 27 cm × 27 cm × 27 cm) connected by an opening (7 cm × 7 cm). The mice were placed into the dark compartment and observed for 5 min. Latency to enter into the lit compartment (all four paws criteria), number of entries, total time spent and distance covered as well as number of rearings and groomings in this compartment were noted. Risk assessment was measured by means of the latency and number of stretch attendances toward the lit area. The incidence of this behavior along the 5 min of the test and the first 30 s (early-stretch attendance)

was also recorded. Defecation boli and urination in each of both compartments were measured.

2.4. Statistics

Statistical analyses were performed using SPSS 17.0 software. All data are presented as mean \pm SEM or percentage. To evaluate the effects of gender, genotype and PH treatment a $2 \times 2 \times 2$ factorial analysis design was applied. Differences were studied through Multivariate General Linear model analysis, followed by *post hoc* Duncan's test comparisons. The relationship between two different variables was analyzed with Pearson's correlations. *P* value < 0.05 was taken as statistically significant.

3. Results

Fig. 1 and Tables 1–3 show the behavioral phenotype exhibited at 6 months of age in the different tests and the effects of PH on these behaviors.

3.1. Corner test

A $2 \times 2 \times 2$ factorial analysis revealed a gender \times genotype \times treatment interaction effect [$S \times G \times T$, $F(1,69) = 4.659$; $p < 0.05$] in the horizontal activity. A genotype effect [G , $F(1,69) = 11.061$; $p < 0.001$] and a gender \times genotype interaction effect [$S \times G$, $F(1,69) = 6.340$; $p < 0.05$] were shown in the vertical activity with both genders of the 3xTg-AD genotype and NTG females exhibiting lower number of rearings (see Fig. 1A). No differences were observed in the latency of the first rearing (data not shown).

3.2. Open field test

The sequence of behavioral events developed in the OF test is detailed in Tables 1–3. Since the beginning of the test, genotype-dependent differences were found in freezing behavior [G , $F(1,69) = 5.662$; $p < 0.05$] and presence of bizarre movements [G , $F(1,69) = 6.555$; $p < 0.05$] (Table 1).

In all the animals, a treatment effect was found reducing the latency of freezing behavior [T , $F(1,69) = 6.055$; $p < 0.05$], PH also reduced the incidence of the animals that performed any kind of bizarre movement [T , $F(1,69) = 20.075$; $p < 0.001$] and, specifically among them, the stereotypic rearing was clearly reduced in all groups [T , $F(1,69) = 14.189$; $p < 0.001$] up to the point that the incidence of this behavior was nearly abolished in the 3xTg-AD mice [T , $F(1,69) = 26.874$; $p < 0.001$]. In the same way, the

treatment also reduced the backward movements in females [$S \times T$, $F(1,69) = 7.783$; $p < 0.01$]. Besides, gender differences were found in the stereotyped stretching [S , $F(1,69) = 9.507$; $p < 0.01$], backward movements [S , $F(1,69) = 14.388$; $p < 0.001$] and when all the four bizarre behaviors were considered together [S , $F(1,69) = 7.012$; $p < 0.01$], with females showing a higher incidence than males.

Latencies of arriving to the periphery and self-grooming behavior during the test were delayed in time in 3xTg-AD mice when compared to NTG mice [G , $F(1,69) = 6.208$; $p < 0.05$ and G , $F(1,69) = 27.767$; $p < 0.001$, respectively] and thus, their total self-grooming activity was lower than their counterpart [G , $F(1,69) = 4.650$; $p < 0.05$].

Regarding the locomotor activity (see Fig. 1B), gender \times genotype interaction effects were found in the horizontal component developed during the test [$S \times G$, $F(1,69) = 4.647$; $p < 0.05$] with males being more active than the females [S , $F(1,69) = 10.276$; $p < 0.01$]. Moreover, both genders of 3xTg-AD mice showed a reduced number of crossings as compared to the NTG mice [G , $F(1,69) = 12.484$; $p < 0.001$]. Furthermore, handling increased this horizontal component in all groups [T , $F(1,69) = 12.464$; $p < 0.001$]. In the vertical activity, gender \times genotype interaction effects were found [$S \times G$, $F(1,69) = 10.544$; $p < 0.01$]. Thus, differences were also appreciable between genders in the NTG mice, with males developing more rearings during the test than females [S , $F(1,69) = 16.638$; $p < 0.001$]. Both genders of 3xTg-AD mice showed a reduced number of rearings as compared to the NTG mice [G , $F(1,69) = 62.334$; $p < 0.001$].

In 3xTg-AD animals but not in the NTG mice, statistical significant Pearson's correlation coefficients were found between different measures of anxiety-like behaviors and bizarre behaviors ["freezing behavior" and "exit of the center" and the presence of "stereotyped stretching" $r < 0.738$, $p < 0.05$ and $r < 0.686$, $p < 0.05$, respectively]. Also ["exit of the center" and "entrance to periphery" and the presence of "backward movements" $r < -0.896$, $p < 0.05$; and $r < -0.805$, $p < 0.05$, respectively].

Finally, defecation was influenced by gender and genotype, with NTG males and both genders of 3xTg-AD mice showing more fecal boli than females [S , $F(1,69) = 5.424$; $p < 0.05$ and G , $F(1,69) = 7.708$; $p < 0.01$, respectively]. Gender differences were found in urination, with males showing a higher incidence than females [S , $F(1,69) = 8.288$; $p < 0.01$].

3.3. Dark and light box test

Gender-dependent differences were observed in most of the parameters evaluated in this test (see Tables 2 and 3 and Fig. 1C). The number of stretch attendances was higher in females [S , $F(1,69) = 13.657$; $p < 0.001$] and handling potentiated these gender differences in the NTG genotype in both the latency [T , $t(1,16) = 2.123$; $p < 0.05$] and the number of episodes [Duncan's test $p < 0.05$].

The incidence of animals that entered into the lit area ranged 60–90% in the NTG mice and increased to the 90–100% in the 3xTg-AD mice. Latency of entering into the lit area in the Tg mice was delayed compared to NTG mice [G , $F(1,69) = 5.333$; $p < 0.05$]. Genotype and gender differences were found in the number of entries into the lit area [G , $F(1,69) = 3.981$; $p < 0.05$ and S , $F(1,69) = 3.976$; $p < 0.05$, respectively]. Moreover, male gender spent more time in the lit area [S , $F(1,69) = 9.828$; $p < 0.01$] performing higher horizontal and vertical locomotor activities as compared to females [S , $F(1,69) = 7.188$; $p < 0.01$ and S , $F(1,69) = 8.137$; $p < 0.01$, respectively]. Also gender \times genotype interaction effects were found in the vertical activity [$S \times G$, $F(1,69) = 7.256$; $p < 0.01$] (see Fig. 1C).

Statistical significant Pearson's correlation coefficients were found in NTG animals between different measures of stretch-attendance and the entrance in the lit area only in no-treated

Table 1
Long-term effects of postnatal handling on bizarre behaviors elicited by 6-months-old C57BL/6 \times 129 and 3xTg-AD mice in the open field test.

	Non-transgenic mice		3xTg-AD mice	
	Males	Females	Males	Females
Non-handled animals				
Stereotyped stretching	–	+	–	+
Stereotyped rearings	+++	+++	+++	++
Backward movements	–	+	–	+++
Jumping	+	–	–	–
Handled animals				
Stereotyped stretching	–	+	–	+
Stereotyped rearings	++	+	++	+
Backward movements	+	+	+	+
Jumping	–	–	–	–

For each of the four bizarre behaviors, the results are expressed as the incidence (percentage, %) of animals exhibiting that behavior: 0%: (–); 0–33%: (+); 33–66%: (++) 66–100% (+++).

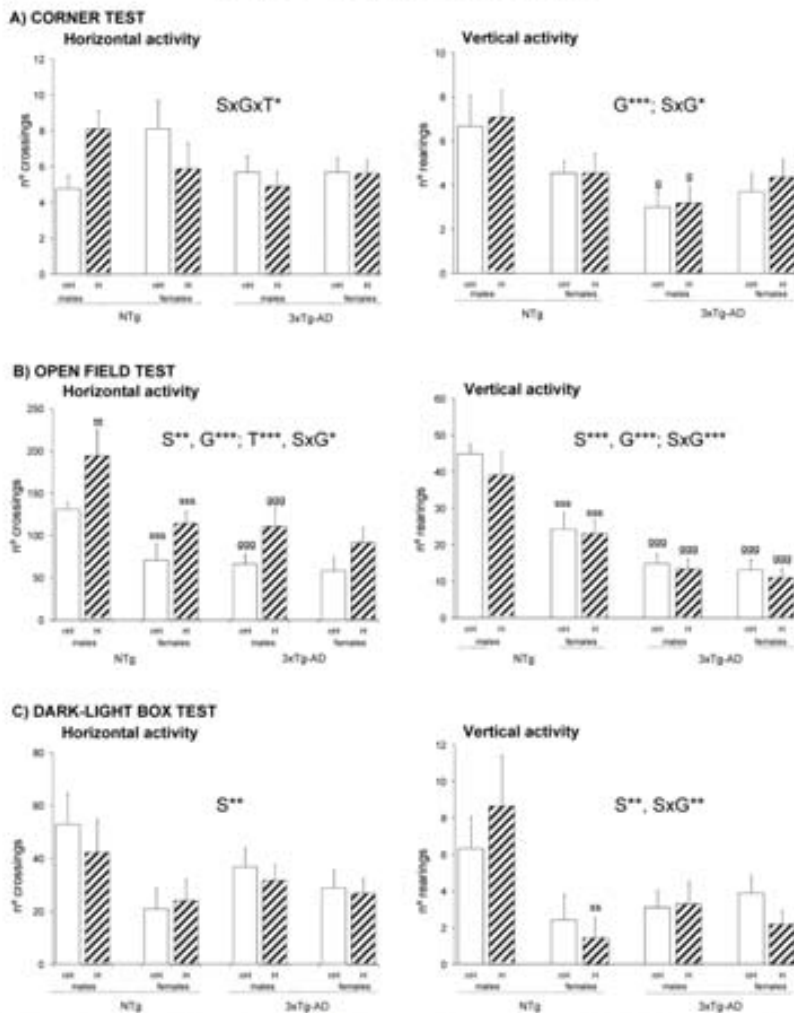


Fig. 8. Long-term effects of postnatal handling on exploratory behaviors in C57BL/6 ($n = 129$) and 3xTg-AD mice at 6 months of age (Fig. 1A–C). Horizontal and vertical activities. Data are expressed by mean \pm SEM. Open bars: non-handled animals; Closed bars: handled animals. ANOVA $2 \times 2 \times 2$: G, genotype effect; T, treatment effect; S = G, gender \times genotype interaction; T = S, treatment \times gender interaction; S = G \times T, gender \times genotype \times treatment interaction. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Post hoc Dunnett's test: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. the corresponding male group; † $p < 0.05$, †† $p < 0.01$ vs. the corresponding NTg group; ††† $p < 0.001$ vs. the corresponding non-handled group.

Table 2
Long term effects of parental handling on coping with stress behaviour and anxiety like behaviour in 1716(1), 1716 and 1674(1) mice at 6 months of age in the open field and the dark light box tests

Coping with stress situation	M 1716(1) n=51	M 1716(1) n=51	M 1716(1) n=51	M 1716(1) n=51	M 1716(1) n=51	M 1716(1) n=51	F 1716(1) n=51	F 1716(1) n=51	Statistics
ANXIETY TESTS									
Open field test									
Latency of the mouse (s)	7.6 ± 2.1	10.4 ± 3.4	11.7 ± 6.8	8.1 ± 1.4	10.1 ± 7.6	7.6 ± 1.2	12 ± 1.8	15.0 ± 14.2	NS
Distance to platform (cm)	13.6 ± 2.2	21.1 ± 7.9	25.1 ± 4.4	20.1 ± 6.8	28.8 ± 7	28.9 ± 6.8	28.3 ± 6.9	16.3 ± 10.8**	U ² , 2-tailed, **
Time of platform (s)	1.8 ± 0.1	0.7 ± 0.4	2.1 ± 0.8	1.6 ± 0.4	1.1 ± 0.8	0.8 ± 0.1	1.6 ± 0.8	1.6 ± 0.1	U ² , **
Dark light box test									
Latency of the mouse (s)	18.4 ± 15.4	10.7 ± 10.2	12.1 ± 10.2	16.4 ± 11	14.0 ± 14.7	10.7 ± 10	17 ± 1.27	49.1 ± 21.4	U ²
Time of platform (s)	10.8 ± 17.2	14.4 ± 11.4	18.2 ± 11	10.7 ± 9	10.2 ± 10.8*	10.1 ± 8.6	10.7 ± 1.4	11.7 ± 1.4	U ²
Head number (s)	1.1 ± 1	1.2 ± 1.7	1.0 ± 1	1.0 ± 1	1.0 ± 0.6	1.7 ± 0.6	1.0 ± 0.6	1.1 ± 1.1	U ² , **
NO STRESS INTERVENTIONS									
Open field test									
Latency (s)	11.9	16.4	16	10**	10	16.2	16	45.0**	U ² **
Distance to platform (cm)	9	9	9	9	11.9	11.9	11.9	19.1	U ²
Time of platform (s)	11.9	11.9	11.9	11.9**	11.9	11.9	11.9	11.9	U ² , **
Head number (s)	9	10.9	9	9	11.9	11.9	11.9	11.9	U ² , **
Time of platform (s)	11.9	11.9	9	9	9	9	9	9	U ²
Distance to platform (cm)	11.9	11.9	11.9	11.9**	11.9	11.9	11.9	11.9	U ² , **
Time of platform (s)	11.9	11.9	11.9	11.9**	11.9	11.9	11.9	11.9	U ² , **
Dark light box test									
Latency (s)	11.9	11.9	11.9	11.9	11.9	11.9	11.9	11.9	U ² , **
Distance to platform (cm)	11.9 ± 11.9	11.9 ± 11.9	11.9 ± 11.9	11.9 ± 11.9	11.9 ± 11.9	11.9 ± 11.9	11.9 ± 11.9	11.9 ± 11.9	U ² , **
Time of platform (s)	11.9 ± 11.9	11.9 ± 11.9	11.9 ± 11.9	11.9 ± 11.9	11.9 ± 11.9	11.9 ± 11.9	11.9 ± 11.9	11.9 ± 11.9	U ² , **

Results are expressed in mean ± SEM or percentage (U²).

ANOVA 2, 2, 2, 2, 2, 2, gender effect, L, genotype effect, L, treatment effect, L, F gender × treatment interaction, U²(all gender × genotype × treatment interaction) *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 that two treatments or gender × time, *p<0.05, **p<0.01 in the corresponding main group, *p<0.05, **p<0.01 in the corresponding WT group, *p<0.05, **p<0.01 in the corresponding non-handled group. Statistical significance are highlighted in bold print.

DOI: 10.1002/eat.11111

Table 2
Long-term effects of postnatal handling on neuroendocrine-related behaviour in C57BL/6J (L26) and 129/SvEv (L27) mice at 6 months of age in the open field and the dark light test.

Neuroendocrine behaviour	60 129/SvEv (L27)	60 C57BL/6J (L26)	60 129/SvEv (L27) × 60 C57BL/6J (L26)	60 129/SvEv (L27) × 60 129/SvEv (L27)	60 129/SvEv (L27) × 60 C57BL/6J (L26)	60 129/SvEv (L27) × 60 129/SvEv (L27)	60 129/SvEv (L27) × 60 C57BL/6J (L26)	60 129/SvEv (L27) × 60 C57BL/6J (L26)	60 129/SvEv (L27) × 60 C57BL/6J (L26)
Open exploration, locomotion									
Open field test									
Latency (s)	322 ± 11.9	360 ± 17.2	213.6 ± 10.6^{***}	186 ± 10.3	120 ± 11.5	130 ± 1.0	226.0 ± 13.6^{***}	213.1 ± 23.6^{***}	NS
Distance (m)	7.6 ± 1.1	8.1 ± 0.8	4.1 ± 0.3	5.1 ± 0.4	3.2 ± 1.1	6.6 ± 1.4	1.0 ± 0.2	1.4 ± 1.2	NS
Dark light test									
Latency (s)	396 ± 28	357 ± 11.7	161 ± 21.8	166 ± 16.4	176 ± 26.2	174 ± 12.6	271 ± 26.2	174 ± 12.6	NS
Distance (m)	5.4 ± 0.8	5.9 ± 0.9	4.5 ± 1.2	5.4 ± 0.9	5.4 ± 1.2	5.3 ± 0.9	5.1 ± 0.9	5.5 ± 0.7	NS
129/SvEv									
Latency (s)	361.7 ± 17.3	362 ± 11.8	360 ± 6.0	360 ± 5.0	360 ± 6.0	360 ± 6.0	360 ± 6.0	360 ± 6.0	NS
Distance (m)	6.2 ± 0.1	6.4 ± 0.8	6 ± 0.0	6 ± 0.0	6 ± 0.0	6 ± 0.0	6 ± 0.0	6 ± 0.0	NS
C57BL/6J									
Open field test									
Total number (s)	5.2 ± 0.4	5.7 ± 0.6	6.6 ± 0.6	6 ± 0.7	5.5 ± 0.7	5 ± 0.7	5.4 ± 0.6	5.5 ± 0.5	NS
Dark light test									
Total number (s)	5.4 ± 0.4	5.1 ± 0.6	5.9 ± 0.6^{***}	5.1 ± 0.5	5.7 ± 0.5	5.4 ± 0.4	6.5 ± 0.6^{***}	6.5 ± 0.6^{***}	NS
NS: not significant.									
Locomotion									
Open field test									
Velocity (m/s)	11.0	10.4	7.0	8.0	10.4	10.4	10 [†]	10.4	NS
Dark light test									
Velocity (m/s)	12.2	11.1	10 [†]	7.0	11.1	12.2	10 [†]	12.2 [†]	NS
NS: not significant.									

Values are expressed as mean ± SEM of percentage (SE).

ANOVA: $F_{(2, 2)} = 2.4$, gender effect: $^*p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$, $^{***}p < 0.001$ and the two-way test: $^*p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$ in the corresponding male group, $^*p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$ in the corresponding 129/SvEv group. Values of specific tests are highlighted in bold print.

DOI: 10.1016/j.psyneuro.2013.07.002 (1101-1107) 1101-1107

males [number of stretch-attendance and latency of entrance, $r < 0.735$, $p < 0.05$; latency and number of stretch-attendance and time in the lit area, $r < 0.769$, $p < 0.05$ and $r < -0.801$, $p < 0.01$, respectively]. Regarding the transgenic genotype, the same correlation between these parameters were found in males [latency of stretch-attendance and time in the lit area, $r < 0.605$, $p < 0.05$] and females [number and latency of stretch-attendance and latency of entrance, $r < 0.608$, $p < 0.05$ and $r < 0.762$, $p < 0.05$, respectively] and number of stretch-attendance and time in the lit area, $r < 0.712$, $p < 0.05$].

Moreover, stretch attendance activity performed in the DLB and the presence of bizarre behaviors and other anxiety-like behaviors performed in the OF were also correlated in all the animals [freezing behavior and presence of bizarre movements and latency of stretch-attendance, $r < 0.664$, $p < 0.05$ and $r < 0.715$, $p < 0.05$ respectively]. Also [freezing behavior, exit of the center and entrance to periphery and number of stretch-attendance, $r < 0.688$, $p < 0.05$, $r < 0.891$, $p < 0.01$ and $r < 0.819$, $p < 0.01$, respectively].

Finally, gender and genotype differences were found in total defecation [S, $F(1,69) = 4.968$; $p < 0.05$ and G, $F(1,69) = 33.199$; $p < 0.001$, respectively] and also in total urination [S, $F(1,69) = 8.036$; $p < 0.01$ and G, $F(1,69) = 11.646$; $p < 0.001$, respectively].

4. Discussion

In the present work we characterize the bizarre behaviors systematically observed in classical unconditioned anxiety-tests as part of the BPSD-like symptoms shown by at early stages of the disease, risk assessment as well as their counteraction by an early life stimulation environment were also studied.

6 month-old male and female 3xTg-AD mice and its NTg strain successively confronted three new environments with different anxiogenic conditions: a mild neophobia in the CT, the direct exposure to an open and illuminated field in the OF, and the choice between two compartments in the DLB test. In such experimental conditions, a detailed qualitative and quantitative analysis of the behavioral responses identified a series of events that were grouped under three behavioral domains: (1) Coping with stress strategies: freezing behavior, bizarre behaviors, risk assessment and choice for protected/unprotected areas; (2) locomotor activity: horizontal and vertical activities; and (3) emotionality-related behaviors: grooming, defecation and urination.

Fight-to-flight coping with stress strategies were the first responses observed in the CT and OF. All the animals, independent of gender and genotype, spent the first seconds completely immobile. After this initial freezing and before leaving the center of the apparatus, some animals also exhibited bizarre behaviors, namely: stereotyped stretching, stereotyped rearings, backward movements and jumps. These horizontal and vertical behaviors were considered bizarre or apparently purposeless repetitive motor stereotypes [13,29] and may represent different kinds of flight-to-flight coping with stress strategies in the 6 month-old animals studied. Actually, these behaviors are usually scarcely reported due to their low incidence in young adult rodents [30] and most of the literature refers to their elicitation after pharmacological challenges [31–35]. For similar reasons, the short duration of the CT test made them to be hardly reportable. In contrast, in the OF, as our preliminary data suggested, at 6 months of age the development of these behaviors was frequent enough to be quantified, not only when these behaviors were grouped as a unique category but also when considered individually. For instance, in females, stereotyped stretching was a conspicuous bizarre behavior. The elicitation of these behaviors in the center of the apparatus implied a delay to enter to the periphery that made difficult to observe clear

differences in thigmotaxis (preference for the protected areas) since only they were observable in the 3xTg-AD treated females. The present results point out the age of 6 months as an interesting time point not only to study spontaneous bizarre behaviors, but also their gender component and their modulation by rearing environmental conditions such as PH.

This fact has special interest in the case of 3xTg-AD mice since at this age they are known to model the early stages of disease when only intra-neuronal immunoreactivity to β A is detected [16]. At the clinical level, severe behavioral abnormalities have been correlated with increases in dopamine (DA) content and reduced striatal D2 receptors in the striatum of the AD patients. Moreover, stressful stimuli are known to lead to increased extracellular DA concentrations in mesolimbic, mesostriatal and mesocortical DAergic pathways [36,37] as well as increases of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis activity [38]. Interestingly, dysregulation of the stress-responsive HPA axis is another feature of AD at the neuroendocrine level [39].

Similarly, spontaneous repetitive, unvarying behavioral patterns in home cages and automated devices have been described in APP23 [40], PS1-A245E [41] and TgCRND mice [42]. For instance, APP23 mice often rear and jump continuously against the walls of their home cage. In these models, elevated DA levels, known to be able to elicit stereotypes in rodents [43], but also serotonin and opioids have been proposed as neurochemical bases of the stereotyped behaviors [44–46]. Age- and sex-dependent hyperactivity of the HPA axis was found in old 3xTg-AD [24] and TgCRND mice [47]. In the latter animal model, aberrant motor activity behaviors were correlated with elevated corticosterone metabolite concentrations suggesting their lower ability to cope with stressors [43]. On the other hand, bizarre behaviors could be indirectly caused by AD pathology in the hippocampus and amygdala which are worsened by the HPA axis hyperactivity/glucocorticoid cascade postulated by [48]. In fact, here we report the enhancement of bizarre behaviors in 6 month-old 3xTg-AD mice, the same age where we have already demonstrated a deleterious role of intra-neuronal β A accumulation in BLA glutamatergic pyramidal neurons on the amygdala-dependent emotional responses [17].

The present analysis also provides new evidences concerning the existence of BPSD-like symptoms in both genders of 3xTg-AD mice at early stages of the disease [5,6,49]. For any of the behavioral domains studied, open-field test resulted the most sensitive to show the genotype and gender differences as well as to demonstrate, for the first time, the benefits of PH. The fight-to-flight coping with stress strategies of 3xTg-AD mice exhibited in the OF were increased as compared to the NTg counterparts. Freezing and bizarre behaviors were enhanced, with stereotyped behavior being those showing the highest incidence. Besides, the negative correlation of freezing and bizarre behaviors with horizontal locomotor activity demonstrated that they are strongly involved in the reduction of locomotion described for 3xTg-AD mice when studied under anxiogenic conditions [5,6,49].

Postnatal handling (PH), commonly used to study the effects of environmental factors on development and plasticity during the ontogeny, is also able to induce long-lasting positive effects on a diversity of behavioral and neurobiological responses (reviewed by [22]). Thus, long-term actions of PH have been reported in the serotonergic, dopaminergic and GABAergic neurotransmission as well as in the cyclic AMP and PLC second messengers systems, and shown to counteract glutamatergic excitotoxic insults and aged-related cognitive or histological changes [However, the effects of PH on the HPA axis responses are probably the ones providing the most relevant results at the functional level [18,19,22] to such an extent that PH is able to modify genetically inherited anxious-like behavioral traits [50]. In agreement with this, the present study shows that the first observable long-lasting beneficial effect of PH

in NTg and 3xTg-AD mice was the attenuation of freezing behavior. This effect has been commonly reported as a benefit of PH on coping with stress strategies in rats [51] and in mice [52]. Here we also demonstrated, in both genotypes and genders, that PH was able to counteract bizarre behaviors. Wrakshlak and Weinstock [53] reported a similar effect of PH in stereotypes induced pharmacologically. Also, it has been reported that bizarre behavior spontaneously elicited under restricted environmental conditions can be reduced when animals are transferred to an enriched housing [15]. Therefore, bizarre behaviors elicited under anxiogenic conditions in standard strains or emphasized in animal models for disease seem to be eligible to be improved by early life interventions like PH.

Stretch attendance, considered to assess the risk of entering into the lit area [54], was observed in most of the animals studied in the DLB. Both the latency and the number of episodes of this behavior exhibited a strong gender effect and were enhanced by PH. This is interesting to note since a similar PH effects enhancing gender-related differences were also found in C57BL/6 strain for its susceptibility to a degenerative disorder [55]. Both variables measuring stretch attendance showed that this risk assessment behavior was inversely correlated to the time spent in the lit area, that is, the anxiety shown by the animals. This is important to note since we have previously shown that in both genders of psychogenetically rats selected for low and high anxiety (BIA/Verh-1 and BIA/Verh-1 rats, respectively) as well as in the heterogeneous stock of N/Nb-HS rats, risk assessment was independent of anxiety-like behavior [50,56]. In agreement with previous work [5] the gender differences in anxiety observed in the NTg group disappeared in the 3xTg-AD genotype due to the disinhibitory behavior of female 3xTg-AD. On the other hand, the bidirectional effects of PH potentiating risk assessment and reducing freezing and bizarre behaviors evidence its actions in the different neuroanatomical substrates involved in coping with stress strategies. Recent studies corroborate similar beneficial effects of early-life events in front of coping with stress in the adulthood [57,58].

In all the three behavioral tests, rearings consistently showed sexual dimorphism while the reduction in both components of locomotor activity evidenced the genotype effects. Strikingly, the present work highlights that the effects of PH were restricted to the horizontal locomotion known to be sensitive to the presence of anxiety [59]. In contrast, the vertical activity, which is considered to better reflect exploratory behavior [60,61], was not modified at all. Interestingly, this vertical exploratory activity was positively correlated with stereotyped rearings which were counteracted by PH. Therefore, it seems that the benefits of PH are mostly related to anxiety but not to vertical exploratory activity per se. This may suggest that the different effectiveness of PH relates to its actions at diverse neuroanatomical substrates.

Finally, emotional-related behaviors, that is grooming, defecations and urination, also showed a strong impact of genotype and gender factors. Overall, the important gender effect, consistently found in all of the behavioral domains, emphasize the relevance to consider gender in the experimental designs, in order to screen the complete effects in the real population and in the disease.

5. Conclusion

In summary, the present work shows that the age of 6 months is suitable to study bizarre behaviors elicited in a standard strain studied under experimental anxiogenic conditions. An important gender component in most of the behavioral events developed during the anxiety tests is also reported. Bizarre behavioral pattern in 3xTg-AD mice differs from that of NTg animals and it is correlated with other anxiety behaviors, locomotion and emotionality.

PH exerted long-lasting effects which were selective for coping with stress strategies but not on exploratory activity per se. Moreover, these beneficial effects of PH were bidirectional, potentiating risk assessment and reducing freezing and bizarre behaviors. These results are in favor with the beneficence of early-life interventions on the behavioral outcome at the adulthood both in healthy and disease conditions. As shown, the consideration of bizarre behaviors and risk assessment may become an additional tool for evaluating BPSD-like symptoms in relation to preventive and/or therapeutic strategies targeted at AD. It may also have a role in the evaluation of the potential risk factors for the disease.

Acknowledgments

The work was supported by Instituto de Salud Carlos III, ISCIII PI10/000283, Spain and Red Envejecimiento y Fragilidad, RD06/0013/00023. The Research group 'Behavioral Neuroscience' is a member of 'Animal and Human Models in Mental Disorders' recognized as 2009-SGR-0051 by Generalitat de Catalunya. R.B.C. receives a predoctoral grant PI-DGR (2012FLRI 00198) from Secretaria d'Universitat i Recerca del Departament d'Economia i Coneixement de la Generalitat de Catalunya. We thank Denise Kinoshita for her assistance in the administration of the postnatal handling procedure. The animals used in the present study come from the colony of homozygous 3xTg-AD and wild-type NTg mice established by Dr. Lydia Giménez-Llort at the Universitat Autònoma de Barcelona, Spain, from progenitors kindly provided by Prof. Frank M. LaFerla, Department of Neurobiology and Behavior, University of California Irvine, California, USA.

References

- Giménez-Llort L, Blázquez C, Gilibert T, Blázquez B, Dado S, Tellería A, et al. Modeling behavioral and neuronal symptoms of Alzheimer's disease in mice: a role for environmental context. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 2007;31(1):125–47.
- Sloan D, Carter M, Matarazzo D, Fuchsank L, Cummings JL. Neuropsychiatric symptoms and quality of life in Alzheimer disease. *The American Journal of Geriatric Psychiatry* 2005;13:869–74.
- Tan LL, Wong WB, Allen H. The impact of neurophysiologic symptoms of dementia on distress in family and professional caregivers in Singapore. *International Psychogeriatrics* 2005;17:233–43.
- Piccolini M, Di Carlo A, Baldereschi M, Caracci G, Frisiani D. Behavioral and psychological symptoms in Alzheimer's disease: frequency and relationship with duration and severity of the disease. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders* 2000;19(5–6):276–81.
- Giménez-Llort L, García-Baccari R, Revilla L, Suredá C, Cruzblanca R, et al. Gender-specific neuroinflammatory responses to treadmill exercise in 3xTg-AD mice. *International Journal of Alzheimer's Disease* 2010;2010:128194.
- García-Mesa Y, López-Ramos JC, Giménez-Llort L, Revilla L, Guerra R, Cruzblanca R, et al. Physical exercise protects against Alzheimer's disease in 3xTg-AD mice. *Journal of Alzheimer's Disease* JAD 2011;24(3):421–34.
- García-Mesa Y, Giménez-Llort L, López JC, Vasegas C, Cruzblanca R, Escames C, et al. Melatonin plus physical exercise are highly neuroprotective in the 3xTg-AD mouse. *Neurobiology of Aging* 2012;33(6):1124e13–1124e29.
- Jones C, Westaway D. Transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *Physiology & Behavior* 2001;77(2):73–86.
- Torres-Lima V, Giménez-Llort L. Impairment of nesting behaviour in 3xTg-AD mice. *Behavioral Brain Research* 2013;247:153–7.
- Willner P. Animal models as simulations of depression. *Trends in Pharmacological Sciences* 1991;12(4):131–6.
- Giménez-Llort L, Hernandez-Torres A, Escarotilla RM, Fernández BB, Tellería A, Pellegri M, et al. Mice lacking the adenosine A1 receptor are anxious and aggressive, but are normal learners with reduced muscle strength and survival rate. *The European Journal of Neuroscience* 2002;14(3):547–56.
- Ölberg HD. The influence of cage size and environmental enrichment on the development of stereotypes in bank voles (*Chthomys glareolus*). *Behavioral Processes* 1987;14(2):155–75.
- Power SB, Newman HA, Pendegast JF, Lewis MH. A rodent model of spontaneous stereotypy: initial characteristics of developmental, environmental, and neurobiological factors. *Physiology & Behavior* 1999;66(2):333–43.
- Latham N, Blomie C. Frustration and generalization in stereotypic captive animals: is a state of enrichment worse than noise at all? *Behavioral Brain Research* 2010;211(1):196–204.

- [139] Cross AN, Bickner SD, Engel AG, Marbel H. Cage-induced stereotypies, perseveration and the effects of environmental enrichment in laboratory mice. *Behavioural Brain Research* 2012;234:1761–6.
- [140] Odden S, Carrasco A, Shephard JD, Murphy MP, Galda TE, Kaye R, et al. Triplet-transposon model of Alzheimer's disease with plaques and tangles associated with Aβ and synaptic dysfunction. *Neuron* 2003;39(3):409–21.
- [141] Tupała J, Gómez-Liét L, Valero J, Mirano A, Kibano A, Rodríguez-Alvarez J, et al. Intraneuronal β -amyloid accumulation in the amygdala enhances fear and anxiety in Alzheimer's disease transgenic mice. *Biological Psychiatry* 2010;67(6):513–21.
- [142] Antonini N, Zabara M, Mearry MJ, Merrill Z. Do early-life events permanently alter behavioral and hormonal responses to stressors? *International Journal of Developmental Neuroscience* 1998;16(3–4):149–64.
- [143] Levkov S. Influence of psychological variables on the activity of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *European Journal of Pharmacology* 2006;405(1–2):149–60.
- [144] Chapillon F, Patin Y, Rey Y, Vauzour A, Cottin J. Effects of pre- and postnatal stimulation on developmental, emotional, and cognitive aspects in rodents: a review. *Developmental Psychobiology* 2002;41(4):373–87.
- [145] Fernández-Teruel A, Gómez-Liét L, Escobedo RM, Gil J, Aguilar R, Torner F, et al. Early-life handling stimulation and environmental enrichment: are some of their effects mediated by similar neural mechanisms? *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 2002;73(1):213–45.
- [146] Hudson A, W. Goshup AM, Vogel E, Mittleman BN, Lerman S, Belzung C. Early life genetic, epigenetic and environmental factors shaping emotionality in rodents. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 2005;29(8):1333–46.
- [147] Clonier SA, Billings LM, Green KN, Carrasco A, Hogg J, Odden S, et al. Age-dependent neural dysregulation in response and stress response in the 3xTg-AD mice. *Neurobiology of Disease* 2007;28(1):576–82.
- [148] Gómez-Liét L, Arias L, Mateo J, De la Torre MA. Gender-specific neuroendocrine rise aging in a triple transgenic 3xTg-AD mouse model for Alzheimer's disease and its relation with longevity. *Neuroendocrinology* 2008;33(4–6):331–43.
- [149] Papapanicolas A, Genazzoni K, Prodromou A, Bilias S, Stylianopoulos F. Sex differences in the effects of neonatal handling on the animal's response to stress and the vulnerability for depressive behavior. *Behavioural Brain Research* 2002;129(1–2):131–9.
- [150] Panagiotopoulos T, Pardo S, Papapanicolas A, Alkandari F, Stamatidis A, Genazzoni R, et al. Neonatal handling and gender modulate brain monoamines and plasma corticosterone levels following repeated stressors in adulthood. *Neuroendocrinology* 2004;80(3):181–91.
- [151] Dalla C, Pylkova PM, Kozlov N, Papadopoulos-David Z. Sex differences in response to stress and expression of depressive-like behaviors in the rat. *Current Topics in Behavioral Neurosciences* 2011;6:87–110.
- [152] Kilkeny C, Brown WJ, Cahill K, Emerson M, Abram DG. Improving literature search reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. *Journal of Pharmacology & Pharmacokinetics* 2010;1(2):94–9.
- [153] Pineda MF, Gibson BC, Lewis MS. Effects of neonatal administration of selective dopaminergic ligands on spontaneous stereotypy in mice. *Physiology & Behavior* 2004;80(4):433–9.
- [154] Powell SR, Newman HA, McDonald TA, Bughrigane P, Lewis MS. Development of spontaneous stereotypic behavior in deer mice: effects of early and late exposure to a more complex environment. *Developmental Psychobiology* 2000;37(2):190–8.
- [155] Galati A, Irsini RC, DiLewin RN. An analysis of stereotypic behavior in moustique rats. *Neuro-Schizophrenia Archives of Pharmacology* 1988;137(3):372–5.
- [156] Raudap A, Soininen C, Kibajashi M. Stereotyped behavior in animals induced by stimulant drugs at a restricted cage environment: relation to disrupted behavior, brain dopamine and psychiatric disease. *Tokushima University Journal* 1989;30(2):113–27.
- [157] Gómez-Liét L, De Vera M, Martínez E. Analysis of chemically-induced alterations of the rearing activity in rats. *Neuroendocrinology* 1998;19(3):371–9.
- [158] Kitazuka J, Kitazuka N, Tanaka T, Miyoshi A, Kusumoto A, Tanaka K, et al. Pre-treatment with L-lysine reduces a shift from methamphetamine-induced stereotypic liking to persistent locomotion in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 2013;94(1):464–70.
- [159] Van Nieuwenhuijzen AE, Wulke DJ, Kuhn CM. Sex differences in novelty- and prefrontal-stimulus-induced behaviors of C57BL/6 mice. *Psychopharmacology* 2012;223(3):187–98.
- [160] Fain L, Pirella A, Cessa G. The role of stress in the pathophysiology of the dopaminergic system. *Molecular Psychiatry* 2000;5(1):14–23.
- [161] Giorgi D, Luca D, Pini G, Di Ciccio F, Conda MG. Disruption between monochemical dopamine release and fear-related behaviors in two psychogenetically selected lines of rats that differ in coping strategies in aversive conditions. *The European Journal of Neuroscience* 2003;17(12):2738–26.
- [162] van Hout D. The concept of stress and its relevance for animal behavior. *Advanced Study Behavior* 1988;27:1–131.
- [163] Manda K, Tanimoto S, Terada T, Itozumi T, Kikugi T. Elevated urinary free cortisol in patients with dementia. *Neurobiology of Aging* 1991;12(2):161–5.
- [164] Lalonde R, Dumont M, Gaudinville M, Scahillier-Pierart C, Strazielle C. Spatial learning, exploration, anxiety, and motor coordination in female AP22 transgenic mice with the Swedish mutation. *Brain Research* 2002;950(1):36–44.
- [165] Lalonde R, Quin J, Scahillier C. Transgenic mice expressing the P51-A246 mutation: effects on spatial learning, exploration, anxiety, and motor coordination. *Behavioural Brain Research* 2001;130(1):71–9.
- [166] Andler G, Tsouma C, Gillet R, Ruysser G, Fuchs H, Falon E, et al. Activity changes and methyl cholinergic behavior provide a pathway in TgCRND Alzheimer mouse. *Neurobiology of Aging* 2006;27(7):953–64.
- [167] Mason GJ. Stereotypy: a critical review. *Animal Behaviour* 1981;41:1013–37.
- [168] Cahit S. Neurobiology of brain stereotypies. In: Lawrence AB, Bolles J, editors. *Stereotypy: animal behavior, fundamental and applications to welfare*. Wallingford: CAB International; 1993. p. 119–49.
- [169] Pappert D, Gotti CG, Belloni CT, Nelson M, Carvey PM. 5-Hydroxytryptophan-induced stereotypies in guinea pigs: mediation through 5-HT1D receptor subtypes. *European Journal of Pharmacology* 1998;347(1):51–6.
- [170] Carter PJ, Mason GJ. Evidence for a relationship between age stereotypy and behavioral disinhibition in laboratory rodents. *Behavioural Brain Research* 2002;130(1):83–92.
- [171] Tsouma C, Andler G, Gillet R, Ruysser G, Lemeroyan L, Falon E, et al. Age- and sex-dependent development of adrenergic hyperactivity in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging* 2004;25(7):893–904.
- [172] Sapelli RM, Rios K, McEwen BS. The neuroendocrine biology of stress and aging: the glucocorticoid and catecholamines. *Endocrine Reviews* 1990;7(3):284–301.
- [173] Carrasco A, Liét L, Bazzano C, Cahete S, Biza K, Vial M, Odden S, et al. Modelling stereotypic symptoms of Alzheimer's disease dementia in 3xTg-AD mice. In: Iqbal K, Wiedholz B, Avila J, editors. *Alzheimer's disease: new advances*. Puntarenas, RI, Italy: Medknow SRL; 2006. p. 313–6.
- [174] Aguilar R, Gil J, Fernández-Teruel A, Salera A. Genetically-based neuronal traits influence the effects of shuttle box avoidance events on learning and extinction upon interval responding: a study with the mouse rat strains. *Behavioural Processes* 2004;66(1):63–72.
- [175] Mearry MJ, Mitchell JB, Aitken DA, Blumhagen S, Bellhoff SB, Iley J, et al. The effects of neonatal handling on the development of the adrenocortical response to stress: implications for neuropathology and cognitive deficits in Late Onset. *Psychoneuroendocrinology* 1991;16(1):85–103.
- [176] Sternberg WM, Bellucci CC. Effects of gestational stress and neonatal handling on pain, analgesia, and stress behavior of adult mice. *Physiology & Behavior* 2001;78(3):375–83.
- [177] Mahabadi A, Weisskopf M. Neonatal handling reverses behavioral abnormalities induced in rats by prenatal stress. *Physiology & Behavior* 1990;48(2):289–92.
- [178] Brown M, Haxner M. The mouse light/dark box test. *European Journal of Pharmacology* 2002;463(1–2):23–45.
- [179] Colombo-Cabrera S,UFFALIZIO G, Chianetti F, Alessi S, Cerullo F. Early handling increases core reactivity to experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in C57BL/6 male mice. *Journal of Neuroimmunology* 2006;212(1–2):10–6.
- [180] Lopez-Aumatell R, Guitián-Matijev M, Vicens-Cintas E, Gómez-Liét L, Valdez W, Johansson M, et al. Fos/Renilin in a large N/10 genetically heterogeneous rat strain: differential profiles of Fos/renilin and behavior in males and females. *Behavioral Brain Research* 2008;186(1):41–55.
- [181] Bouffard N, Antoniazou CT, Pavoni C, Berridge JM, Day VL, Segal HG, et al. Neonatal handling prevents anxiety-like symptoms in rats exposed to chronic mild stress: behavioral and molecular parameters. *Stress* 2012.
- [182] Marcolin Melo L, Benito Ade R, Arango DM, Nurchang C, Kriebel R, Dulzid C. Effects of early life interventions and palatable diet on anxiety and on oxidative stress in young rats. *Physiology & Behavior* 2012;96(4):491–8.
- [183] Roy V, Chapillon F. Further evidence that risk assessment and object exploration behaviors are useful to evaluate emotional reactivity in rodents. *Behavioural Brain Research* 2004;154(2):439–46.
- [184] Gómez-Liét L, Martínez S, Ferris S. Different effects of dopamine antagonism on spontaneous and NMDA-induced motor activity in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 1997;50(1):949–53.
- [185] Calzavara BA, Shanks B, Gomez TM, González-Pardo H, González-Lima F. Effects of maternal separation, early handling, and standard facility rearing on orienting and impulsive behavior of adolescent rats. *Behavioural Processes* 2006;71(1):51–6.

Annex 2.

Manuscript

Persistent hyperactivity and distinctive strategy features in the Morris Water Maze in 3xTg-AD mice at advanced stages of disease

Baeta-Corral R^{1,2}, Giménez-Llort L^{1,2*}

¹ Institute of Neuroscience and ² Department of Psychiatry and Forensic Medicine, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain

Corresponding author at: Unitat de Psicologia Mèdica, Departament de Psiquiatria i Medicina Legal, Facultat de Medicina, Avinguda Can Domènech, Edifici M s/n Campus Bellaterra, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain. Tel.: +34-93-5812378; Fax: +34-93181435; E-mail address: lidia.gimenez@uab.cat (L. Giménez-Llort)

Abstract

Search strategies in the Morris water maze provide useful insights on the cognitive function that may reveal genotype differences not reflected by escape latency or distance. Its analysis is pointed out as a complementary tool to better define the phenotype and the effect of treatments in animals models where both cognitive impairment and **behavioral symptoms** reproduce the clinical complexity of the **Alzheimer's disease** patient. **Here we studied** the performance of 13 month-old male 3xTg-AD mice in three different paradigms (cue learning, place task and probe trial), and as compared to age-matched non-transgenic mice. The quantitative analysis (escape latency, distance and speed) showed that in all the tasks the cognitive performance of 3xTg-AD mice was interfered by a persistent hyperactive pattern. Their worse cognitive function was revealed by the qualitative features of non-search behaviors (floating and circling) and search strategies (single/mixed; goal-non-goal directed). The search pattern was based on mixed and non-goal directed strategies in contrast to single and goal-directed strategies used by controls. In the place task, poor cognitive flexibility of 3xTg-AD mice was also shown as a persistence of search in the cue trained position

and the need to correct the strategy in order to find the new location. Trials involving a naïve situation (first trial of cue task) or the difficulty of a new task (first trial of the place task and the probe trial) were the most suitable to show the deficits. This qualitative analysis may be also useful to assess preventive and/or therapeutical treatments.

Keywords

BPSD-like symptoms; search strategies; cognitive flexibility; spatial orientation; translational

Research Highlights

- 13 month-old 3xTg-AD mice showed a persistent hyperactivity pattern in the water maze
- The search strategies of NTg mice involved the use of single and goal-directed strategies
- Worse cognitive function in 3xTg-AD mice was shown by non-goal directed strategies
- A high proportion of mixed strategies in 3xTg-AD mice also evidenced their impairments
- Trials involving naïve or difficult tasks were the most suitable to show the deficits

Introduction

Alzheimer's disease (AD) is mostly conceived as a dementia in spite of its 'Behavioral and Psychological Symptoms' (BPSD) being quite prevalent among the patients since early stages of disease (Reisberg *et al.*, 1987). It is also worth noting that with the neurodegenerative progress, BPSD become the most important source of distress that leads to institutionalization (Tann *et al.*, 2005). Efforts to model this clinical complexity are being done at the translational level (reviewed by Giménez-Llort *et al.*, 2007). However, most of the experimental research in animal models of AD is focused on the cognitive deficits while a scarce number do also considers the concomitant neuropsychiatric symptoms (i.e. anxieties, phobias, bizarre behaviors, hyperactivity, disinhibition, diurnal rhythm disturbances among others). This is also a relevant issue in the assessment of AD preventive and/or therapeutic strategies, that should not be just restricted to their mnemonic effects but also look for benefits on this other array of symptoms (Anand *et al.*, 2014).

A part of the inherent difficulty of modeling this clinical heterogeneity in animals, the coexistence of cognitive and BPSD-like profiles may imply mutual influences in many experimental paradigms. Thus, the presence of neuropsychiatric-like symptoms may interfere with the final measurable cognitive outcome or even to ensue paradoxical results. In the case of 3xTg-AD mice (Oddo *et al.*, 2003) where a relevant expression of the BPSD-like profile has been described (i.e. Giménez-Llort *et al.*, 2006; Stemiczuk *et al.*, 2010), this is a fact important to take into account. For instance, enhancement of the conditioned contextual fear response but spatial learning and memory deficits in the Morris water maze were found in a same set of 3xTg-AD as well as APP_{swE} and APP_{swE/mid} mice (España *et al.*, 2010). Interestingly, this divergent behavioral outcome in these two learning and memory paradigms was critical to demonstrate involvement of enhanced A β accumulation in the basolateral amygdala as an underlying neurobiological substrate. Therefore, the coexistence of both BPSD-like pattern and cognitive deficit it is not just the most translational scenario but the one that may better help to specify mechanisms underlying dysfunction.

The influence of activity and emotional profiles in the classical Morris water maze for learning and memory is largely known (reviewed by D'Hooge & De Deyn, 2001). In this test, some behavioral variables are susceptible to generate false positive or negative results when hyperactivity or floating is exhibited.

Thereby, trajectory covered is considered to reflect better the process of acquisition of the task, with the distance travelled leading to more reliable results than the escape latency (Gerlai., 2001). Furthermore, the features of navigation and search strategies contribute to provide a more comprehensive behavioral phenotyping (i.e., Grötendorst *et al.*, 2001; Lang *et al.*, 2003). Similarly, in AD-transgenic mice, the analysis of the navigation strategies is pointed out as a complementary tool to reflect better the AD-phenotype (Janus *et al.*, 2004; Brody *et al.*, 2006). However, in models such as the 3xTg-AD mice which also present the BPSD-like pattern, a systematic analysis of how concurrent cognitive and BPSD-like determine their performance in the Morris water maze has not yet been done. For such a purpose, in the present work we studied 3xTg-AD mice at advanced stages of disease, where presence of BPSD-like symptoms is common (García-Mesa *et al.*, 2012). The animals confronted three different tasks in the Morris water maze: cue learning, place task and probe trial. We performed a quantitative analysis (variables of time distance and speed) but also evaluated the qualitative features of non-search behaviors (floating and circling) and search strategies (goal-directed and non-goal directed). This work provides evidence that these features are useful to distinguish 'persistent hyperactivity' and the 'use of mixed and non-goal directed search strategies' as characteristic for the 3xTg-AD genotype, that can be also a useful tool in the assessment of the treatments or the impact of risk factors.

Materials and methods

Animals

Sixteen 13-month-old male mice from the Spanish colonies of hybrid C57BL/6 x129 strain and triple-transgenic 3xTg-AD mice with the same genetic background were used ($n=8$, in both groups). 3xTg-AD mice harboring PS1^{M146V}, APP^{Swe} and tau^{P301L} transgenes were genetically engineered at the University of California Irvine, as previously described (Oddo *et al.*, 2003). Genotypes were confirmed by RT-PCR analysis. Animals were maintained under standard laboratory conditions (food and water *ad libitum*, $22 \pm 2^\circ\text{C}$, a 12 h dark/light cycle, 50-60% humidity). The study was performed in accordance with the Spanish legislation on "Protection of Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes", 2010/63/EU

Council on this subject. The study comply with the ARRIVE guidelines developed by the NC3Rs (Kilkenny *et al.*, 2010).

Behavioral assessments

Morris water maze

Mice were trained to locate a hidden platform (7 cm diameter, 1 cm below the water surface) in a circular pool for mice (Intex Recreation Corp. CA, USA; 91 cm diameter, 40 cm height, 25 °C opaque water), located in a completely black painted 6m² test room. Mice failing to find the platform were placed on it for 10s, the same period as the successful animals. The protocol (Giménez-Llort *et al.*, 2007) was used as follows: one day of cue learning, four days of place learning followed by a probe trial.

Day 1, Cue learning with a visible platform

Animals were trained for four visible platform trials of 60 s/day; the platform was elevated 1 cm above the water level in the N position, was indicated by a visible striped flag (5.3x8.3x15 cm), whereas extra maze cues were absent in the black painted walls of the room.

Days 2-5, Place learning with a hidden platform

This involved four trial sessions per day, with trials spaced 30 min apart. The mouse was gently released (facing the wall) from one randomly selected starting point (E or W, as these are equidistant from the target) and allowed to swim until escaped onto the hidden platform which was now located in the middle of the S quadrant. White geometric figures, one hung on each wall of the room, were used as external visual clues.

Day 5, Probe trial

On day 5, 1h 30min after the last trial, the platform was removed from the maze and the mice performed a 'probe trial' of 60s to evaluate their spatial memory for the platform position.

Quantitative analysis

Behavior was evaluated by both direct observation and analysis of videotape recorded images. Variables of time (escape latency, quadrant preference), distance covered and swimming speed were analyzed in all the trials of the tasks. The escape latency was readily measured with a stopwatch by an observer unaware of the animal's genotype and confirmed during the subsequent video-tracking analysis. A video camera placed above the water maze recorded the animal's behavior and thereafter an automated system (Smart, Panlab S.L., Barcelona, Spain) enabled computerized measurement of the distance travelled by the animal during the trials. The swimming speed (cm/s) of the mice during each trial was calculated. In the probe trial, the time spent in each of the four quadrants, the distance travelled along them and the number of crossings over the removed platform position (annulus crossings) were also measured retrospectively by means of the automated video-tracking analysis.

Qualitative analysis

Strategy choice in the water maze reveals complex tasks solving in cognitive paradigms (Terry, 2009). Furthermore, it does not necessarily affect the escape latency, the most common used quantitative measure (Janus, 2004). To a less extent, the strategies may not be always reflected by the distance variable as well. Therefore, swimming strategies have been extensively characterized by the features of their trajectories mostly based on their goal or non-goal directionality (Janus, 2004). In the present work we have used this systematic analysis to detect changes in the swimming plot of 3xTg-AD mice. We compared the frequencies of commonly observed and readily identifiable swim strategies in each of the paradigms of the water maze in order to find those which distinguish between both genotypes. Thus, the swim paths for each mouse in each trial of the cue learning task, place learning task and probe trial were analyzed according to the following strategies.

Non-search behaviors:

Floating: a state of inactivity without forward movement. The incidence and duration of this activity was measured by a direct observation of the experimenter.

Circling: swimming in tight circles, often showing a general directional movement. The plotted path was short and wide when tight circles were performed, or had many visible loose loops when was performed with a random search strategy.

Search strategies:

Non-goal directed strategies

Thigmotaxis (wall-hugging swim): a persistent swim along the wall of the pool that could include sporadic swims toward the center of the pool.

Random search: swimming over the entire area of the pool in straight swims (zig-zag pattern), or in wide circular swims.

Chaining swim: circular swimming at a fixed distance from the wall, in which the escape platform was located.

Goal directed strategies

Scanning: the search path was restricted to a limited, often central, area of the pool.

Focal search: searching in a restricted area of the pool. The path in a focal search was characterized by a directional, straight swim to a specific area followed by dense concentration of superimposed loops and turns there. Focal search was divided into focal search in a target quadrant, and focal search in the cued platform position quadrant.

Direct swim: represented by a straight or simple swim path to the location containing the escape platform.

In the progress of the work, we found that some 3xTg-AD mice started a trial using a non-goal directed strategy but suddenly corrected it into a 'direct swim'. According to this distinctive feature (non-goal corrected to 'direct swim') we labeled this strategy as "*Corrected strategy*".

The use of each search strategy was presented as a percentage of incidences during each trial over the whole analyzed experimental period. The codification of the strategies was done upon computerized trajectory analysis by an experimenter blind to the experiment and was, thereafter, verified by a second observed.

Concurrently, strategies were categorized in single strategies (use of a unique strategy per trial) or mixed strategies (use of two or more strategies per trial). The proportion of trials using single vs. mixed strategies were analyzed in each genotype.

Statistics

Results are expressed as mean \pm SEM or as incidence of certain behaviors (swimming strategies). Frequency of non-search behaviors and swimming strategies was calculated as the total number of trials presenting that behavior in each paradigm. Differences between genotype (G) and time x genotype (TxG) interval interactions in the different MWM tasks were analyzed by RMA, Repeated Measures ANOVA. Paired t-test was used to compare differences between two trials. In all cases, statistical significance was considered at $P < 0.05$.

Results

Figure 1 and 2 illustrate the quantitative analyses of the variables of time, distance and speed in the different paradigms of the Morris water maze. The qualitative analyses of non-search behaviors and search strategies are depicted in figure 3. Besides, figure 4 illustrates representative swimming strategies for each group of animals.

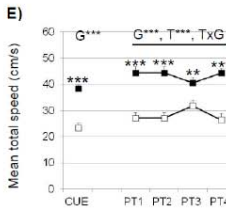
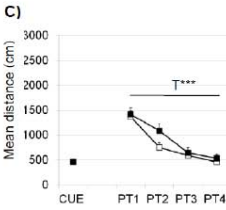
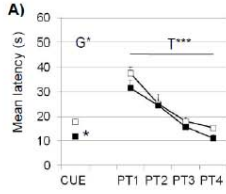
Quantitative analysis

As shown in figure 1, the genotype differences found in the mean latency of the cue learning task [Fig. 1A, G, $F(1,15)=6.289$; $p<0.05$] were missed when using distance variable [Fig. 1C, G, $F(1,15)=0.001$; $p=0.975$, *n.s.*]. In the place learning task, a 'time' effect indicated the presence of an acquisition process for both variables of mean latency [Fig. 1A, RMA, T, $F(3,42)=22.805$, $p<0.001$] and distance covered [Fig. 1C, RMA, T, $F(3,42)=31.585$, $p<0.001$]. Only a further 'trial by trial' analysis (Fig 1B and 1D) showed 'genotype x time' interaction effects [all PT1, PT2 and PT3, TxG, $F(3,42)>3.036$, $p<0.05$] and some genotype differences in particular trials, mostly for latency variable [G, all $F(1,15)>4.552$, $p<0.05$]. The acquisition level achieved at the end of the place learning task was similar in both genotypes [latency, PT4.T4, G ($1,15$)= 4.354 ; $p>0.05$, *n.s.*; distance covered, PT4.T4, G ($1,15$) = 0.642 ; $p>0.05$ *n.s.*]. A consistently faster

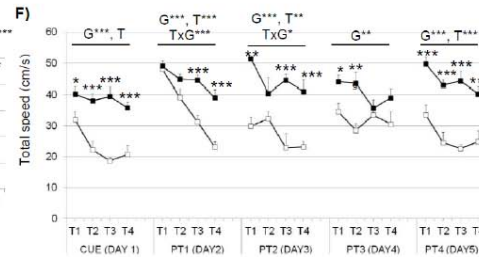
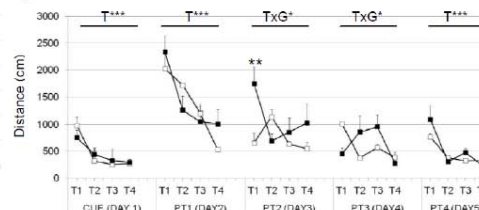
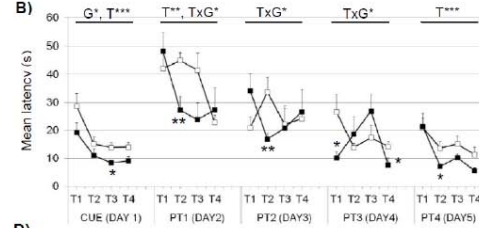
swim speed phenotype in the 3xTg-AD mice was found in both cue learning [RMA, G, $F(1,15)=39.355$; $p<0.001$] and in the place task, [RMA, G, $F(1,15)=29.593$; $p<0.001$] (Fig. 1F). Similar results were obtained when floating behavior was taken into account and its contribution on time was discarded (not shown). The probe trial (Fig. 2) measured memory as the preference for the trained quadrant and the accuracy (number of annulus crossings) to reach the prior location. There, again, the variables of time and distance were not sensitive to detect genotype differences whereas the swimming speed [G, $F(1,15)=7.594$; $p<0.05$] perfectly did. Overall, the quantitative results aware that under these experimental conditions the cognitive outcome was strongly conditioned by the genotype differences in swimming speed.

CUE & PLACE LEARNING TASKS

'Day by day'



'Trial by trial'



□-NTg ■-3xTg-AD

Figure 1. Quantitative analysis of the cue and place learning tasks assessed in the MWM test in NTg and 3xTg-AD mice at 13 months of age. 'Day by day' (left) and 'trial-by-trial' (right) analyses. Data are expressed by mean \pm SEM. Open squares: NTg mice, Filled squares: 3xTg-AD mice. ANOVA 2x2: G, genotype effect; T, time effect; TxG, time x genotype interaction effect; * p <0.05, ** p <0.01, * p <0.001. *t*-Student test: * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001 vs. the corresponding NTg group.**

PROBE TRIAL

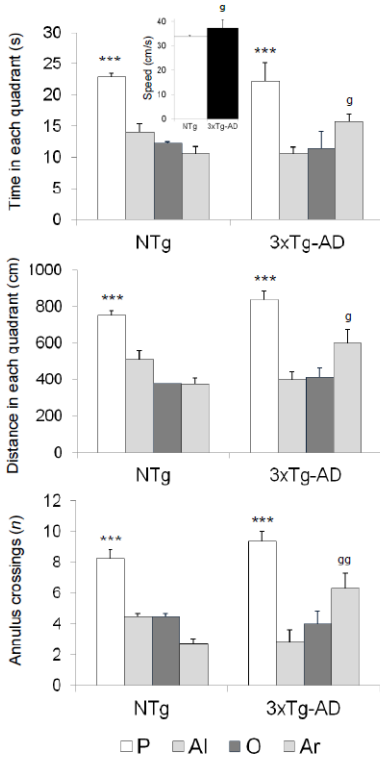


Figure 2. Probe trial assessed in NTg and 3xTg-AD mice at 13 months of age. Data are expressed by mean \pm SEM by time spent in the Platform (P), Adjacent left (Al), Opposite (O) and Adjacent right (Ar) quadrants. Statistics: Between groups, t-Student test.: ^g $p < 0.05$, ^{gg} $p < 0.01$ vs. the NTg group. Within groups, ANOVA, ^{***} $p < 0.001$ P vs. all quadrants

Qualitative analysis

Qualitative features of the navigation strategies were analyzed in the three water maze paradigms according to the existence or not of a search strategy. They were categorized as follows:

Non-search behaviors

In the C57Bl/6 NTg mice the non-search behaviors were characterized by a high frequency of floating (Fig. 3A) along the test [G, $F(3,42)=10.836$; $p<0.01$]. A 'time' [T, $F(3,42)=4.191$; $p<0.01$], 'genotype' [G, $F(1,14)=10.078$; $p<0.001$] and 'time x genotype' interaction effects were found [TxG, $F(3,42)=2.957$; $p<0.05$] in the duration of this behavior. In contrast, 3xTg-AD circled more often than their counterparts in the cue and place learning tasks [both, G, $F(1,15)=6.266$, $p<0.05$]. Interestingly, a time effect was found during the place task [T, $F(3,42)=3.212$, $p<0.05$] as a result of the reduction of this non-search behavior through the test (Fig. 3B).

Search strategies

Search strategies exhibited were analyzed for each paradigm:

Cue learning task

In the first experience in the water maze, random search was observed in most of the 3xTg-AD and NTg animals. In the successive trials, all the animals progressively changed their random search to a goal-directed strategy (Fig. 3D).

Place learning task

On the next day, most of the NTg mice swam 'directly' to the previous platform position in contrast to 3xTg-AD mice that used a non-goal directed 'chaining' or 'random' swim strategy [Fisher exact test; $p<0.05$]. When animals failed to find the platform in the expected position, most of them switched their strategy to 'random' swim to search the hidden location [$F(7,56)=7.000$ vs. all other strategies, $p<0.001$], while in the transgenic genotype, 'chaining' was the predominant strategy [$F(7,56)=2.970$ vs. all other

strategies, $p < 0.01$]. Therefore, on this first day, the acquisition process of the new hidden platform position implied the use of more than one strategy in the same trial.

Genotype statistical significant differences were found when the data from the second to the fourth day was considered (see Fig. 3C and 3D) as follows: 1) the proportion of animals using 'mixed' vs. 'single' strategies [$\chi^2_{(2)} = 10.093$; $p < 0.001$], 2) 'non-goal' vs. 'goal directed' strategies [$\chi^2_{(2)} = 11.443$; $p < 0.001$], 3) searching the platform in the previously trained location [Fisher exact test; $p < 0.01$]. In particular, NTg animals showed a higher proportion of 'single' and 'goal-directed' strategies with 'direct swim' and 'focal search' as the predominant [F(7,56)=39.111, both vs. all the others, $p < 0.001$]. In contrast, 3xTg-AD mice persisted using 'mixed' strategies and 'non-goal directed' strategies with 'chaining' or 'random' swim as the most common ones [F(7,56)=12.888 both, $p < 0.001$] (Fig. 4). However, with the progress of the acquisition task, this poor cognitive performance shown by 3xTg-AD mice was improved by training since the mutant mice exhibited a correction of their navigation trajectory on PT3 and PT4 ['corrected swim' Fisher exact test; $p < 0.05$].

Probe trial

All animals (100%) swam 'directly' to the usual hidden platform and when they failed, they used another strategy. However, NTg mice alternated goal (scanning) and non-goal directed (chaining) strategies [F(7,56)=42.666, vs. all other strategies, $p < 0.001$] whereas most of the 3xTg-AD animals persisted using only one, either a goal or a non-goal directed [incidence (%) alternation of strategies, $z = 2.157$, NTg vs. Tg, $p < 0.05$].

NON-SEARCH AND SEARCH STRATEGIES

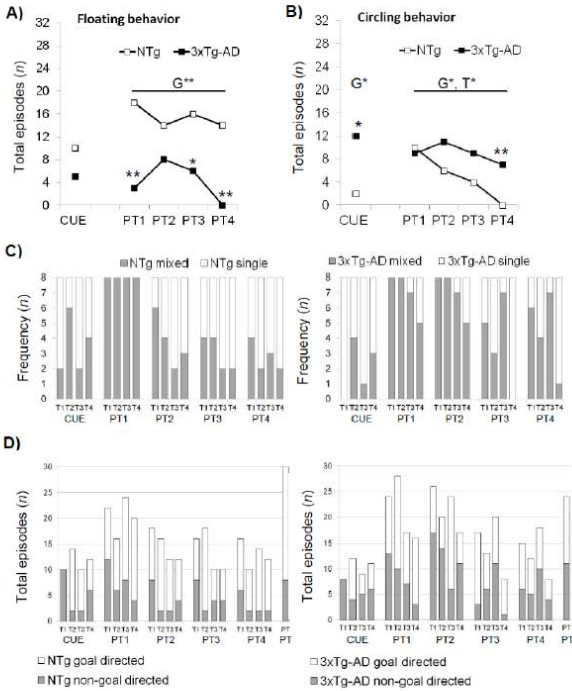


Figure 3. Qualitative analysis of the non-search and search strategies assessed ‘trial by trial’ in the paradigms of the MWM test in NTg and 3xTg-AD mice at 13 months of age. Flotation behavior (Fig 3A), Circling (Fig 3B), Single vs. mixed strategies (Fig 3C) and Goal vs. non-goal directed strategies (Fig 3D). Data are expressed by frequency or total number of episodes (*n*).

RMA: G, genotype effect; T, time effect; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

Post-hoc: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. the corresponding NTg group.

SEARCH STRATEGIES

	GLOBAL ANALYSIS	DETAILED ANALYSIS				
CUE T1						
	'random search'					
PT1 T1						
	'random search'	'direct swim' to trained platform position	'scanning'	'random search'		
PT2 T1						
	'direct swim'					
PT3 T1						
	'direct swim'					
PT4 T1						
	'direct swim'					
PROBE TRIAL						
	'random search'	'direct swim'	'focal search'	'scanning'	'chaining'	

	GLOBAL ANALYSIS	DETAILED ANALYSIS				
CUE T1						
	'random search'					
PT1 T1						
	'random search'	'wrong focal search'	'chaining'	'chaining in the trained quadrant'		
PT2 T1						
	'random search'	'random search'	'chaining'	'chaining'	'scanning' with 'circling' in the trained quadrant	'wall hugging'
PT3 T1						
	'random search'	'focal search'	'scanning' in the trained quadrant	'corrected strategy'		
PT4 T1						
	'random search'	'random search'	'circling'	'corrected strategy'		
PROBE TRIAL						
	'random search'	'direct swim'	'chaining'	'chaining'	'chaining'	

Figure 4. Representative swimming strategies in the paradigms of the MWM shown in NTg (top) and 3xTg-AD groups of mice (bottom) at 13 months of age. Global analysis (left) and detailed analysis (right)

where all the strategies performed by a representative animal of each genotype are illustrated. Open circle: platform position in the cue task, Closed circle: platform position in the place task.

Discussion

The present study provides a detailed phenotyping of the water maze performance of 13 month-old 3xTg AD mice where concomitant cognitive and BPSD-like features determine a distinctive behavioral performance. The quantitative measures detected genotype differences in the mean escape latency of the cue learning task as well as in the swimming speed exhibited in all the tasks performed. Most of these results confirmed the presence of a strong BPSD-like profile while escape latency and distance covered were less accurate to reflect the AD-related impairment. The increased swimming speed found in all the paradigms, independently of the difficulty of the task, confirms the existence of a consistent hyperactivity pattern as also previously described in actimeter (Giménez-Llort *et al.*, 2007) and voluntary wheel running cages (García-mesa *et al.*, 2011) and forced-swim test (Torres-Lista and Giménez-Llort, 2014). It is considered that hyperactivity or the presence of floating (Porsolt *et al.*, 1977) render to a lower reliability of these quantitative variables (Gerlai, 2001). To avoid this problem and assess cognition with less influence of concomitant activity or emotional patterns, some authors do a previous training of the animals in the task or administer handling procedures that attenuate or even abolish them. However, our purpose is to perform a phenotyping considering both the existence of cognitive impairment and BPSD-like patterns and, instead, we use such procedures as non-pharmacological interventions (Baeta-Corral and Giménez-Llort, 2013). Therefore, in the present work, the qualitative analysis provided additional insights to assess the cognitive impairment based in the animal's strategies used during these task-solving paradigms. Similarly, in previous reports done in other mutant models, such as the knockout for A₁R mice (Lang *et al.*, 2003) the analysis of the navigation strategies showed genotype differences not reflected by single measures such as escape latency or swim path.

Furthermore, the distinction of non-search behaviors (floating and circling) from search strategies allowed to do a more refined definition and distinction of the features of each genotype. Noticeably, a high frequency of floating was exhibited by the NTg animals. Here, it is interesting to remind that, contrary to rats, the Morris water maze test entails a stressful condition for mice that is often overcome with floating

behavior that could be linked to a lack of motivation, even as a kind of behavioral despair (Porsolt *et al.*, 1977). As aforementioned, despite some authors defend that animals have to be habituated to the water maze and swimming in water before assessing any task on this test, we suggest that in fact, it is the naïve condition which better reflects how anxiety and emotional-related behaviors may interfere in complex tasks-solving cognitive paradigms. In the transgenic genotype, the preferential non-search behavior was circling. This non-search behavior could be considered as a stereotyped with copying with stress purposes. Interestingly, a reduction of circling was observed through the test, supporting this hypothesis.

The cognitive flexibility in the 3xTg-AD and NTg mice was studied taking into consideration that single or mixed strategies can be present in a particular trial. In contrast, most of the studies reduce the analysis to the predominant strategy of each trial (Grötendorst *et al.*, 2001; Lang *et al.*, 2003; Janus, 2004; Brody and Holtzman, 2006; Collison, *et al.*, 2012; Barack *et al.*, 2013). Qualitative criteria based on non-goal vs. goal directed strategies, similar to the atrophic non-spatial or spatial search strategy classification, did also contribute to do a more refined distinction between the 3xTg-AD and NTg genotypes.

Overall, the cue task allows to control for sensorimotor or motivational confounding factors and to establish post-habituation baseline before the hidden place task (Guinello *et al.*, 2009). It is also relevant to point out that its first trial also entails a 'naïve' condition to measure cognitive abilities, in contrast to the 'experience' in the maze that drives the performance in the subsequent trials. As expected, when the animals were released into the water for the first time, with no previous experience or knowledge of the task, random search was observed in most of the 3xTg-AD and NTg animals. Learning is influenced by the experience (Donato *et al.*, 2013) and this could be seen as the progressive change of the random search to goal-directed strategies along the successive trials. Hence, direct swim became the most observed strategy, partly because of the intramaze cue facilitating the localization of the platform (Giménez-Llort *et al.*, 2013). In this task, the performance was optimal in all the animals. Probably, because this task does not require the development of spatial mapping strategy for its solution (Janus, 2004) both 3xTg-AD and NTg mice were able achieve the same level of post-habituation baseline.

Regarding the place learning, the change of position of the platform increased the difficulty of the task (Giménez-Llort *et al.*, 2013). In its first trial, animals failed to find the platform in the previous trained position. Genotype differences were found in the task solving strategies used to find the new location. In the subsequent trials, the performance of 3xTg-AD mice was characterized by the use of 'mixed' strategies (several strategies performed in a single trial) and a high incidence of non-goal directed strategies. Poor cognitive flexibility of 3xTg-AD mice was also shown as a persistence of search in the cue trained position and the need to use a 'corrected' strategy to find the new location.

In the probe trial, the last paradigm, all the animals swam directly to the expected platform position. Once they failed to find it there, genotype differences were found in the performance of the search strategies used during the rest of the 60 seconds trial. 3xTg-AD mice persisted in the search of the platform using 'chaining' while the strategy choice of NTg mice was more mixed (Cuthbert *et al.*, 2007).

Conclusions

In summary, a detailed qualitative 'trial by trial' analysis allowed to find different navigation patterns in old 3xTg-AD mice as compared to NTg animals. Overall, the use of several strategies in a single trial, high incidence of non-goal directed strategies, persistence of focal search in the previous platform position and circling were found as characteristic for 3xTg-AD mice. Trials more suitable to reflect genotype differences are those that involve either a naïve situation (first trial of the cue learning task) or the difficulty of a new task (first trial of the place task and the probe trial).

Acknowledgments

The work was supported by Instituto de Salud Carlos III, ISC3 PI10/00283, Spain and Red Temática de Investigación Cooperativa en Envejecimiento y Fragilidad, (RETICEF) RD12/0043/0018 from the ISCIII-FEDER of the European Union. The Research group 'Behavioral Neuroscience' is a member of 'Animal and Human Models in Mental Disorders' recognized as 2009-SGR-0051 by Generalitat de Catalunya. R.B.C receives a predoctoral grant FI-DGR (2012FI_B1 00198) from Secretaria d'Universitat i Recerca del Departament d'Economia i Coneixement de la Generalitat de Catalunya. The animals used in the present study come from the colony of homozygous 3xTg-AD and wild-type NTg mice established by Dr. Lydia

Giménez-Llort at the Universitat Autònoma de Barcelona, Spain, from progenitors kindly provided by Prof. Frank M. LaFerla, Department of Neurobiology and Behavior, University of California Irvine, California, USA.

References

- Anand, R., Gill, K. D., & Mahdi, A. A. (2014). Therapeutics of Alzheimer's disease: Past, present and future. *Neuropharmacology*, *76 Pt A*, 27–50.
- Baeta-Corral, R., & Giménez-Llort, L. (2014). Bizarre behaviors and risk assessment in 3xTg-AD mice at early stages of the disease. *Behavioural Brain Research*, *258*, 97–105.
- Barak, B., Okun, E., Ben-Simon, Y., Lavi, A., Shapira, R., Madar, R., Ashery, U. (2013). Neuron-specific expression of tomosyn1 in the mouse hippocampal dentate gyrus impairs spatial learning and memory. *Neuromolecular Medicine*, *15*(2), 351–63.
- Brody, D. L., & Holtzman, D. M. (2006). Morris water maze search strategy analysis in PDAPP mice before and after experimental traumatic brain injury. *Experimental Neurology*, *197*(2), 330–40.
- Collison, K. S., Makhoul, N. J., Zaidi, M. Z., Saleh, S. M., Andres, B., Inglis, A., Al-Mohanna, F. A. (2012). Gender dimorphism in aspartame-induced impairment of spatial cognition and insulin sensitivity. *PLoS One*, *7*(4), e31570.
- Cuthbert, P. C., Stanford, L. E., Coba, M. P., Ainge, J. A., Fink, A. E., Opazo, P., Grant, S. G. N. (2007). Synapse-associated protein 102/dlgh3 couples the NMDA receptor to specific plasticity pathways and learning strategies. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *27*(10), 2673–82.
- D'Hooge R., & De Deyn, P.P. (2001). Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Research Reviews*, *36* (1), 60–90.

- Donato, F., Rompani, S. B., & Caroni, P. (2013). Parvalbumin-expressing basket-cell network plasticity induced by experience regulates adult learning. *Nature*, *504*(7479), 272–6.
- España, J., Giménez-Llort, L., Valero, J., Miñano, A., Rábano, A., Rodríguez-Alvarez, J., Saura, C. A. (2010). Intra-neuronal β -amyloid accumulation in the amygdala enhances fear and anxiety in alzheimer's disease transgenic mice. *Biological Psychiatry*, *67*(6), 513-521.
- García-Mesa, Y., Lopez-Ramos, J. C., Giménez-Llort, L., Revilla, S., Guerra, R., Gruart, A., Sanfeliu, C. (2011). Physical exercise protects against alzheimer's disease in 3xTg-AD mice. *Journal of Alzheimer's Disease : JAD*, *24*(3), 421-454.
- García-Mesa, Y., Giménez-Llort, L., Lopez, L. C., Venegas, C., Cristofol, R., Escames, G., Sanfeliu, C. (2012). Melatonin plus physical exercise are highly neuroprotective in the 3xTg-AD mouse. *Neurobiology of Aging*, *33*(6), 1124.e13-1124.e29.
- Gerlai, R. (2001). Behavioral tests of hippocampal function: simple paradigms complex problems. *Behavioural Brain Research*, *125*(1-2), 269–77.
- Giménez-Llort, L., Blázquez, G., Cañete, T., Johansson, B., Oddo, S., Tobeña, A., et al. (2007). Modeling behavioral and neuronal symptoms of alzheimer's disease in mice: A role for intra-neuronal amyloid. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *31*(1), 125-147.
- Giménez-Llort, L., Blázquez, G., Cañete, T; Rosa, R, Vivó M., Oddo S., Navarro X., LaFerla FM., Johansson, B., Tobeña, A., Fernández-Teruel A. (2006). Modeling neuropsychiatric symptoms of Alzheimer's disease dementia in 3xTg-AD mice. *Alzheimer's Disease: New Advances*, Iqbal K., Winblad B., Avila J. Medimond SRL, eds, Pianoro (BO), Italy, pp. 513-516.
- Giménez-Llort, L., García, Y., Buccieri, K., Revilla, S., Sunol, C., Cristofol, R., et al. (2010). Gender-specific neuroimmunoendocrine response to treadmill exercise in 3xTg-AD mice. *International Journal of Alzheimer's Disease*, *2010*, 128354.

- Giménez-Llort, L., Rivera-Hernández, G., Marín-Argany, M., Sánchez-Quesada, J. L., & Villegas, S. (2013). Early intervention in the 3xTg-AD mice with an amyloid β -antibody fragment ameliorates first hallmarks of Alzheimer disease. *mAbs*, 5(5), 665–77.
- Grootendorst, J., de Kloet, E. J., Dalm, S., & Oitzl, M. (2001). Reversal of cognitive deficit of apolipoprotein E knockout mice after repeated exposure to a common environmental experience. *Neuroscience*, 108(2), 237–247.
- Gulinello, M., Gertner, M., Mendoza, G., Schoenfeld, B. P., Oddo, S., LaFerla, F., Faber, D. S. (2009). Validation of a 2-day water maze protocol in mice. *Behavioural Brain Research*, 196(2), 220–7.
- Janus, C. (2004). Search Strategies Used by APP Transgenic Mice During Navigation in the Morris Water Maze. *Learning and Memory*, 11 (3) 337–346.
- Kilkenny, C., Browne, W. J., Cuthill, I. C., Emerson, M., & Altman, D. G. (2010). Improving bioscience research reporting: The ARRIVE guidelines for reporting animal research. *Journal of Pharmacology & Pharmacotherapeutics*, 1(2), 94-99.
- Lang, U. E., Lang, F., Richter, K., Vallon, V., Lipp, H.-P., Schnermann, J., & Wolfer, D. P. (2003). Emotional instability but intact spatial cognition in adenosine receptor 1 knock out mice. *Behavioural Brain Research*, 145(1-2), 179–188.
- Oddo, S., Caccamo, A., Shepherd, J. D., Murphy, M. P., Golde, T. E., Kaye, R., 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.
- Porsolt, R. D., Le Pichon, M., & Jalfre, M. (1977). Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature*, 266(5604), 730–2.

- Reisberg, B., Borenstein, J., Salob, S. P., Ferris, S. H., Franssen, E., & Georgotas, A. (1987). Behavioral symptoms in Alzheimer's disease: phenomenology and treatment. *The Journal of Clinical Psychiatry*, *48 Suppl*, 9–15
- Sterniczuk, R., Antle, M. C., Laferla, F. M., & Dyck, R. H. (2010). Characterization of the 3xTg-AD mouse model of Alzheimer's disease: part 2. Behavioral and cognitive changes. *Brain Research*, *1348*, 149–55.
- Tan, L.L., Wong, H.B., Allen, H. (2005). The impact of neuropsychiatric symptoms of dementia on distress in family and professional caregivers in Singapore. *International Psychoger*, *17*, 253–263.
- Terry, AV Jr. (2009). Spatial Navigation (Water Maze) Tasks. *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience*. 2nd edition.

Behavioral assessment

Animals were behaviorally assessed in a battery consisting of 6 tests measuring:

- 1) Coping with stress strategies, exploratory activity and emotional-like behaviors – Corner test, Open-field test and Dark/light box test.
- 2) Working memory – T-maze test.
- 3) Sensorimotor functions – Wood rod test, Metal wire test and Hanger test.
- 4) Pain perception – Where pain threshold to cold water – Tail flick test.

Day 1: Corner test (CT) + Open-field test (OF) Day 2: Dark/light box (DLB)



The mouse is placed in a dark box and its behavior is recorded. The mouse is then moved to a light box and its behavior is recorded again.



The mouse is placed in a T-maze and its behavior is recorded. The mouse is then moved to a different arm of the T-maze and its behavior is recorded again.



The mouse is placed on a wood rod and its behavior is recorded. The mouse is then moved to a different wood rod and its behavior is recorded again.



The mouse is placed in a tail flick test and its behavior is recorded. The mouse is then moved to a different tail flick test and its behavior is recorded again.



The mouse is placed on a metal wire and its behavior is recorded. The mouse is then moved to a different metal wire and its behavior is recorded again.



The mouse is placed on a hanger and its behavior is recorded. The mouse is then moved to a different hanger and its behavior is recorded again.

The anxious profile shown in the younger mice is diminished in the older NTg animals but persists in the 3xTg-AD genotype in the DLB

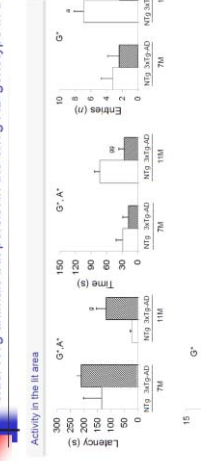


Figure 3. Activity in the II area in CTRL, 3xTg-AD and 7M mice at 7-month-old left of each figure and 11-month-old right of each figure in the DLB test. Error bars represent SEM. * p < 0.05 vs. NTg control; # p < 0.05 vs. 7M control; G* p < 0.05 vs. 3xTg-AD control; G# p < 0.05 vs. 7M control; G*# p < 0.05 vs. 3xTg-AD control; G*# p < 0.05 vs. 7M control. Post hoc Tukey's test: * p < 0.05, # p < 0.05 vs. the corresponding NTg group; # p < 0.05 vs. the corresponding 7-month-old group.

Worsening of the equilibrium in the metal wire test and pain perception impairment in the tail flick test are age-dependent

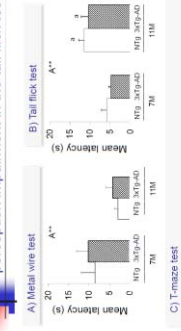


Figure 4. Equilibrium in the metal wire test (Fig. 4A) and pain perception in the tail flick test (Fig. 4B) in CTRL, 3xTg-AD mice at 7-month-old left of each figure and 11-month-old right of each figure. Data are expressed by mean ± SEM. * p < 0.05 vs. NTg control; # p < 0.05 vs. 7M control; G* p < 0.05 vs. 3xTg-AD control; G# p < 0.05 vs. 7M control; G*# p < 0.05 vs. the corresponding 7-month-old group.

Table 1. Incidence of the animals that realized the T-maze task and those that did not realize the T-maze task. The preference index (L/R) is expressed in the table. Data are expressed as incidence (n/total). No statistical analysis could be done due to the low number of animals that did not realize the task in the T-maze test.

	NTg (7M)	3xTg-AD (7M)	NTg (11M)	3xTg-AD (11M)
Animals that realized the T-maze test (n/total)	2/5	5/5	6/10	9/9
Animals that scored a positive preference index (L/R)	1/2	4/5	4/8	3/9

Conclusions

A detailed qualitative and quantitative behavioral analysis detected changes in the anxiety-like behaviors in the different genotypes. It allowed to evaluate the factors involved (age & genotype) in the different behavioral domains:

- **Genotype-dependent differences** were shown in the exploratory activity and anxiety-like behaviors related to entering into lit and open areas.
- **Pain perception was delayed** by aging but the 3xTg-AD mice exhibited the same pain perception as the NTg control animals.
- **Working memory was impaired** in a difficult task such in a metal wire test and was related to aging.
- **Finally, bizarre behaviors** shown at early stages of the disease disappeared during the progression of the disease.

References

Benavides JL, Benavides J, Saez JP, Perez S, Li F, Fransen E, Gonzalez A. 1997. Behavioral symptoms in Alzheimer's disease phenomechanism. *Neurosci Biobehav Rev* 21:1-10.

Chu L, Wang JH, Alamy H. 2002. The impact of neurodegenerative symptoms of dementia on distress in family and professional caregivers in Alzheimer's disease. *Alzheimer Dis Assoc Dis* 16:203-210.

Chen K, Chouinard S, Gauthier S, Gauthier L, Gauthier M, Gauthier R, et al. 2003. Triple transgenic model of Alzheimer's disease with amyloid and tau pathology. *Neurosci Lett* 350:1-4.

Chen K, Gauthier S, Gauthier L, Gauthier M, Gauthier R, et al. 2003. Emerging the spontaneous preference test of recognition: evidence of object-recognition and object-contact recognition. *Behav Brain Res* 141:100-105.

Financial support: C13AG000661. Td-Ar, University of Colorado; TD1005 (Shaw Assessment in Patients with Impaired Cognition, internally "Clemson"), R.C.C. received a P3-AJCUHR predoctoral grant.

