

Universitat de València

Facultad de ciencias biológicas



La funcionalidad de la amígdala en diferentes estados temporales durante el proceso de la patología asociada a la Enfermedad de Alzheimer

Tesis Doctoral

Presentado por:

Ernestina Castro Salazar

Dirigido por:

Dr. Fracisco Olucha Bordonau

Dr. Fracisco Ros Bernal

Tutorizado por:

Dr. Enrique Lanuza

Valencia, Octubre 2021



UNIVERSITAT
JAUME I

Unitat Predepartamental de Medicina
Facultat de Ciències de la Salut

Francisco E. Olucha Bordonau, Profesor Titular de Universidad y **Francisco Ros Bernal**
Profesor Contratado Doctor en el Área de Conocimiento de Anatomía y Embriología Humana de la
Unidad Predepartamental de Medicina en la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universitat
Jaume I de Castellón

CERTIFICAN

Que Doña **Ernestina del Carmen Castro Salazar**, Licenciada en Psicología por la Pontificia
Universidad Católica Madre y Maestra de la República Dominicana y Máster en Neurociencias por
la Universidad de Salamanca, ha realizado bajo nuestra dirección los trabajos de su Tesis Doctoral
titulada: **La funcionalidad de la amígdala en diferentes estados temporales durante el proceso
patológico asociado a la enfermedad de Alzheimer**. Esta Tesis Doctoral ha sido cursada según la
normativa asociada al Programa de Doctorado en Neurociencias de la Universitat de València-
Estudi General y cumple con todos los requisitos para poder ser defendida.

Castellón de la Plana, 29 de Octubre de 2021

FRANCISCO
ELISEO|
OLUCHA|
BORDONAU

Firmado digitalmente por
FRANCISCO ELISEO|OLUCHA|
BORDONAU
Nombre de reconocimiento (DN):
cn=FRANCISCO ELISEO|OLUCHA|
BORDONAU,
serialNumber=18920490T,
givenName=FRANCISCO ELISEO,
sn=OLUCHA BORDONAU,
ou=CIUDADANOS, o=ACCV, c=ES
Fecha: 2021.10.29 07:40:30 +02'00'

FRANCISCO
DE ASIS|
ROS|BERNAL

Firmado digitalmente
por FRANCISCO DE
ASIS|ROS|BERNAL
Fecha: 2021.10.29
08:27:01 +02'00'

Universitat Jaume I
Av. de Vicent Sos Baynat, s/n
12071 Castelló de la Plana, España
Tel.: +34 964 72 80 00 Fax: +34 964 72 90 16

A mi padre

In memoriam

“La ciencia no conoce país, porque el conocimiento pertenece a la humanidad, y es la antorcha que ilumina el mundo” Louis Pasteur

AGRADECIMIENTOS

Aún recuerdo el día que estaba sentada junto a mi padre leyendo un libro de historia y arqueología, aquella tarde de infancia en el salón de casa, como olvidarlo, si fue el día en que leyendo las páginas de aquel libro me inspiré entre sus páginas a realizar un doctorado, recuerdo que al final de sus páginas se describía al escritor como que había realizado su Phd en una universidad Española, y yo le pregunté a mi padre sin conocimiento alguno que significaba la palabra Phd , y el con toda su paciencia y amor, intento explicarle a aquella niña de ese entonces lo que esto era, y yo con toda la fe y sueños que me albergaba mi alma, le dije ...sabes pa, pues yo cuando sea grande quiero ser como ese señor e ir a España a estudiar y hacer mi doctorado. Hoy miro atrás y te doy las gracias, mi querido padre por creer en mí y decirme que todo lo que yo soñara con esfuerzo y dedicación lo podía lograr, a pesar de no tener los recursos para ello fuiste la luz que necesite para volar. Hoy sé que debes de estar desde el cielo viendo la culminación de este sueño, nuestro sueño pa.

Me gustaría agradecer a mis directores de tesis, Dr. Francisco Olucha Bordonau y Dr. Francisco Ros Bernal, el apoyo que me han brindado todos estos años de trayecto desde mis inicios no tiene precio, por la paciencia y disposición para mí siempre. Sin ustedes este trabajo no hubiese sido posible. Un placer conocerlos y aprender de ambos en este camino del saber.

A mi estimado tutor de tesis Dr. Enrique Lanuza, por su apoyo y orientación en todo este camino, desde el comienzo hasta el final y entenderme en todo momento. Gracias, por tanto.

A Esther, Ferran y Conrado, gracias por escucharme siempre que podían y por sus platicas de experiencia y aprendizaje para mí.

A Ana Sánchez, por darme la oportunidad de poder colaborar con la Universidad Jaume I con el proyecto de Alzheimer y por sus pláticas de experiencia en el área científica.

A todos mis compañeros de laboratorio, que hoy día se han convertido en grandes amigos. Gracias por ser como una familia para mí en estos años que estuve lejos de mi país. Gracias Cristina, que te puedo decir mi querida compañera de faena y colega. Gracias por ofrecerme voluntariamente tu hogar cuando llegue a España, al no tener en ese momento donde quedarme, nunca olvidaré ese gesto de solidaridad hacia mi persona, muy feliz de conocerte.

Gracias Sandra, me faltan palabras para agradecerte todo lo que has hecho por mí en estos años, por ser luz y apoyo en momentos difíciles y alegría y compañía en los momentos de soledad. Por siempre tener una palabra de aliento, cuando ya no podía más y no sabía cómo continuar.

Gracias Héctor, porque siempre desde el inicio me orientaste y apoyaste en el laboratorio y por explicarme con toda la paciencia posible lo que no entendía cuando apenas comenzaba en el laboratorio sin ningún conocimiento en el área. Gracias por esa calidad humana que tienes, nunca cambies.

Gracias Nuno por tu gran corazón y compañerismo, nunca olvidaré ese apoyo y soporte para mí en los momentos que estaba lejos de mi familia, por escucharme cada día y preguntarme siempre como estoy y que como iban los experimentos.

Gracias Alberto, feliz de conocerte, eres un ser especial. No está de más decir que te admiro mucho y deseo que sigas logrando todos tus sueños. Como siempre te he dicho la ciencia es tu fuerte.

Gracias Cinta, quiero que sepas que eres de esas personas que con su alegría y con su luz dejan una huella especial en uno. Gracias a la vida por conocerte, que sigas siempre con ese amor y carisma para todo el que te conoce.

Gracias María Teresa, por tu cariño y comprensión. Aprendí mucho de ti, al ver la vida de otra perspectiva. Gracias inmensas por tu apoyo en los momentos que necesite que alguien me escuchara.

Gracias Paola, fuiste de las últimas en conocer en el laboratorio, pero esto no quita el gran cariño y amistad que hoy en día tenemos, estoy segura de que seguirás hacia adelante con tu meta y lograras lo cometido.

Gracias también para mis queridos colegas Bárbara, Hugo, Manoli, Borja, Aroa, Isis, Verónica, Regu, Andrea, y a las dos María, por ser tan especiales para mí, y brindarme su amistad y cariño incondicional. Me llevo de cada uno, una enseñanza de vida.

De igual modo quiero agradecer por el cariño y apoyo a Alicia, Sandra y Oscar del animalario, por siempre estar al pendiente de todo lo que necesitase.

A Esti, en el camino de la vida te vas encontrado con seres especiales, y tu mi manita Esti, eres uno de ellos, gracias por aguantarme, escucharme, apoyarme y mostrarme otra perspectiva de la vida y de la maravillosa cultura de tu querido país, España. Tu hermandad y cariño estarán en mí toda la vida.

A Irina y familia, su cariño y apoyo para mí hizo que no me sintiera tan sola. Gracias por ser una familia para mí y estar en esas fechas especiales donde me sentía triste al estar lejos de mi país. Y no me puedo olvidar también de mi querida Tahiri, gracias por tu luz en los momentos de oscuridad. Y gracias a mi querida Zoé, por su cariño y amistad incondicional desde que nos conocimos.

Gracias Laura, Emely, Yinet, Ermy y Grace porque en este proceso desde el inicio que comenzó este sueño me han dado su cariño como hermanas y han confiado en mí.

A Laura Cordero, amiga que le digo. No me dan las letras para expresar el cariño y agradecimiento que tengo hacia ti, solo me queda decirte gracias por ser, estar y creer.

A Sandy Gutiérrez, no podía dejar de darte las gracias por tu cariño y apoyo en este trayecto de mi vida desde que nos conocimos al solicitar la beca ...en busca también de un sueño que con perseverancia y esfuerzo sé que también lograrás, sigue siempre hacia adelante con tu luz y perseverancia.

A mi querido Dr. Zoilo García, mentor, amigo y colega. Gracias infinitas por estar desde el inicio en este trayecto, cuando aún era una estudiante de grado de psicología en la PUCMM de Santo Domingo, por todas las horas que ha dedicado con su ejemplo y experiencia a mi formación a nivel profesional e integral. Sin su apoyo este sueño no hubiese sido realidad.

A mis queridos Dr. Kiero Guerra, Cynthia Español y Rosario Corominas por su apoyo y cariño para mí siempre en todo este trayecto desde mis inicios.

A mi querida Mar Pacheco, gracias inmensas por creer en mí y apoyarme en todo momento desde lejos, este camino no hubiese sido igual sin ti. Tu solidaridad y bondad para mi fueron soporte y luz, este sueño también es tuyo.

A mi familia, mami no me dan las palabras para expresar lo que siento en este momento, gracias y gracias por tu inalcanzable fortaleza para echarnos hacia adelante desde niños, para que nunca nos faltara nada a pesar de en ocasiones no tener. Eres mi sol cada día. Evarista mi manita mayor, que te digo, este trabajo va dedicado para ti con todo el amor del mundo, Baudilio, mi manito querido también te dedico este trabajo con todo mi cariño, tengo fe en ti y sé que seguirás hacia adelante también con tus metas venideras. Anderson mi otro manito mayor, a ti también las gracias

por tu cariño y apoyo en todo este trayecto y a mi querido padrino Baudilio por inspirarme desde niña a ser el bien y por su ejemplo para mí.

Gracias al Ministerio de Educación Superior Ciencia y Tecnología (MESCyT) y la Pontificia Universidad Católica Madre y Maestra (PUCMM) por la beca y financiación recibida para la realización de mis estudios doctorales y por la realización de este trabajo.

ABREVIATURAS

Aco: Núcleo amigdalino cortical

AOB: Bulbo olfatorio accesorio

APOE4: Apolipoproteína E4

A β : Beta-amiloide

BACE1: Beta-secretasa

BLA: Amígdala basolateral

ANOVA: Análisis de varianza

CeA: Amígdala central

CCA: Corteza cingulada anterior

CCAp: Corteza cingulada anterior perigenual

CE: Corteza entorrinal

CP: Corteza Perirrinal

CPF: córtex prefrontal

CP: Corteza prelímbica

CPFdm: Áreas dorsomediales del córtex prefrontal

CPFm : áreas mediales del córtex prefrontal

CPH: Corteza parahipocampales

CPVm : Áreas ventromediales del córtex prefrontal

CTF: Fragmento C-terminal

CxA: Área de transición cortico-amígdala

DSM: Manual de Diagnóstico Estadístico de Trastornos Mentales

DCL: Deterioro cognitivo leve

EA: Enfermedad de Alzheimer

EOAD: Enfermedad de Alzheimer de inicio temprano

GWAS: Estudio de asociación de genoma

IEG: Genes tempranos inmediatos

LOAD: Enfermedad de Alzheimer de inicio tardío

NFT: Ovillos neurofibrilares de tau hiperfosforiladas

OF: Laberinto de campo abierto

OMS: Organización Mundial de la Salud

PA: amígdala posterior

Pir: Corteza piriforme

PMv: núcleo premamilar ventral

PREN1: Presinilina 1

PREN2: Presinilina 2

LTM: Lóbulo temporal medial

LTM: Memoria a largo plazo

MAP: proteína asociada a los microtúbulos

MeA: amígdala Medial

mOFC: Corteza frontal orbital medial

MATP: microtúbulo asociado a la proteína tau

MeAad: Amígdala dorsal

MeAav: amígdala anteroventral

MeApd: amígdala posterodorsal

MeApv: amígdala posteroventral

MeA: Amígdala medial

MPOA: Área preóptica medial

NORT: Prueba de reconocimiento de objetos novedosos

NAcc: Núcleo accumbens

STM: Memoria a corto plazo

SSC: Corteza somatosensorial

TC: Corteza temporal

VMH: Hipotálamo ventromedial

VNO: órgano vomeronasal

Vhpc: Hipocampo ventral

INDICE DE FIGURAS

1.1.1	Figura 1. Alous Alzheimer	5
1.1.4	Figura 2. Estadios de Braak I-VI	9
1.1.6	Figura 3. Ruta de degeneración postulada en la enfermedad de EA	13
1.5.2	Figura 4. Representación gráfica de la creación del ratón 3xtg-AD	38
2.2.1.1	Figura 5. Prueba de laberinto elevado	45
2.2.1.2	Figura 6. Prueba de campo abierto	48
2.2.2.1.	Figura 7. Prueba de reconocimiento de objetos novedosos (NOR)	51
2.2.2.2	Figura 8. Test de reconocimiento social	54
3.1.1	Figura 9. Determinación del nivel de ansiedad en el laberinto elevado	61
3.1.1	Figura 10. Determinación del nivel de ansiedad en la prueba de campo abierto	63
3.1.2	Figura 11. Prueba de reconocimiento de objetos novedosos	65
3.1.3	Figura 12: Prueba de sociabilidad y reconocimiento social	69
3.2	Figura 13. Núcleos de la amígdala y la corteza piriforme.	73
3.2	Figura 14. Activación genética temprana e inmediata en áreas relacionadas con el comportamiento social, después de las pruebas de comportamiento	72

RESUMEN

La Enfermedad de Alzheimer (EA) es el tipo de demencia más común a nivel mundial. Su aumento está relacionado con la esperanza de vida y el envejecimiento del adulto mayor. Esta enfermedad es una enfermedad neurodegenerativa irreversible, que a medida que avanza en la persona que la padece va desencadenando un déficit en varias esferas integrales del ser humano, como la cognitiva, funcional, emocional y conductual. La sintomatología de la enfermedad a nivel clínico se caracteriza primeramente por la pérdida de la memoria, la atención, concentración, orientación y el lenguaje, tanto hablado como escrito, pues a medida que avanza la enfermedad se ha observado un declive en áreas del cerebro relacionadas con estas funciones, como se ha visto en diferentes estudios (H. Braak & Braak, 1991). Las áreas más afectadas que podemos destacar son: el hipocampo, la amígdala y la neurocorteza. En la actualidad, para el estudio de la EA se emplean diferentes modelos animales que simulan los diferentes marcadores que se observan en la enfermedad como son: los depósitos de las placas de péptidos amiloides y la formación de los ovillos neurofibrilares (NFT). En este trabajo analizamos si existen alteraciones en la conducta en relación con la memoria y el reconocimiento social asociados a los depósitos neuropatológicos en la EA en el modelo de ratón 3xTgAD en diferentes estados temporales.

Para nuestro estudio hemos utilizados ratonas 3xTgAD y ratonas tipo salvaje (WT), salvaje (B6129F/J) de diferentes estadios de edad a partir de los 3 meses de edad hasta los 15 meses. Las cuales estuvieron emparejadas por edad y tuvieron acceso a agua y comida ad libitum. Fueron criadas en las instalaciones

del servicio de experimentación animal (SEA) de la Universidad Jaume I (UJI). En este estudio hemos comparado el comportamiento de las ratonas 3xTgAD y controles en varias pruebas conductuales para medir la capacidad cognitiva y la memoria social. Como son las pruebas de: Laberinto Elevado, Campo Abierto, Reconocimiento de Objetos Novedosos (NORT) y la prueba de Tres Habitaciones (3 Chamber-room). Luego que los animales realizaran la prueba de comportamiento, aproximadamente no más de una hora después, se procedió al sacrificio de los animales. Para evaluar el nivel de proteína neuronal de fos por inmunohistoquímica posteriormente de la prueba se procedió a realizar el análisis estadístico.

En cuanto a los resultados obtenidos evaluando la activación neuronal, hemos encontrado una disminución en la señalización neuronal en los animales 3xtg-ad en comparación con los controles en Aco y Mea a los 9 meses, en Pir III a los 12 meses y en Pir II a los 15 meses. Por otro lado, al realizar las pruebas de comportamiento se observó un fenotipo de desinhibición en nuestras ratonas 3xTgAD, al pasar más tiempo en la prueba de Laberinto Elevado en los brazos abiertos que sus homólogas controles. Encontrándose estos resultados solo a los 3 meses de edad. En la prueba de campo abierto no se observó ninguna diferencia significativa en ambos grupos. Por otra parte, los datos obtenidos en la prueba NORT, señalan que los animales realizaron bien la prueba en todos los estadios temporales en la primera prueba de familiarización. Sin embargo, a la hora de realizar la segunda prueba de reconocimiento de objetos novedosos, nuestras ratonas 3xTgAd de edades de 9 hasta los 15 meses, mostraron un índice de discriminación disminuido en comparación con las controles. En los

resultados de la prueba de Tres habitaciones (3 three-room) que mide la memoria social, hemos obtenido que en la prueba de socialización las ratonas controles pasaron más tiempo con el coespecífico que con el objeto, que es lo esperado, sin embargo, las ratonas 3xTgAD no discriminaron entre ambos o visitaban más el objeto que al ratón como las ratonas de 15 meses de edad. En cuanto a la prueba de discriminación social, las ratonas del grupo control pasaron más tiempo con el animal nuevo que con el animal familiar, pero las ratonas 3xTgAD no discriminaron entre ambos animales o como en el caso de las de 12 y 15 meses de edad pasaron más tiempo con el ratón familiar que con el ratón nuevo.

El modelo 3xTgAD puede ser un buen modelo para continuar estudiando el mapeo de las áreas de la amígdala relacionadas con la memoria social aumentando los núcleos a estudiar y el número de muestra, ya que se pudo observar una disminución en algunos núcleos de la amígdala de los animales experimentales en comparación con sus controles y esto nos podría arrojar luz en la patología de la EA a nivel de las esferas cognitiva y emocional que se ve afectada en el paciente que padece la enfermedad. Se sabe que pocos estudios nos han arrojado datos en cuanto a el estudio de la memoria emocional y el reconocimiento social que se observa en este paciente y hemos podido contactar que a medida que avanza la enfermedad estas áreas se ven más afectadas a nivel del cerebral, llevando al desconocimiento social del sujeto a la hora de reconocer.

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is the most common type of dementia worldwide. Its increase is related to life expectancy and aging of the elderly. This disease is an irreversible neurodegenerative disease, which as it progresses in the person who suffers it, triggers a deficit in several integral spheres of the human being, such as cognitive, functional, emotional, and behavioral. The symptomatology of the disease at the clinical level is characterized firstly by the loss of memory, attention, concentration, orientation and language, both spoken and written, because as the disease progresses, a decline has been observed in related areas of the brain with these functions, as has been seen in different studies (H. Braak & Braak, 1991). The most affected areas that we can highlight areas: the hippocampus, the amygdala and the neurocortex. At present, for the study of AD, different animal models are used that simulate the different markers that are observed in the disease, such as: the deposits of the amyloid peptide plaques and the formation of neurofibrillary tangles (NFT). In this work we analyze whether there are alterations in behavior in relation to memory and social recognition associated with neuropathological deposits in AD in the 3xTgAD mouse model in different temporal states.

For our study we have used 3xTgAD mice and wild-type (WT), wild-type (B6129F / J) mice of different age stages from 3 months of age to 15 months. They were age-matched and had access to guide and food ad libitum. They were raised in the facilities of the animal experimentation service (SEA) of the Jaume I University (UJI). In this study we have compared the behavior of 3xTgAD mice and controls on various behavioral tests to measure cognitive ability and social

memory. As are the tests of: Elevated Maze, Open Field, Novel Objects Recognition Test (NORT) and the Three Chamber. After the animals performed the behavior test, approximately no more than one hour later, the animals were sacrificed. To evaluate the level of neuronal protein of fos by immunohistochemistry, after the test, the statistical analysis was carried out.

Regarding the results obtained by evaluating neuronal activation, we have found a decrease in neuronal signaling in 3xtg-ad animals compared to controls in Aco and Mea at 9 months, in Pir III at 12 months and in Pir II at 15 months. On the other hand, when performing the behavioral tests, a disinhibition phenotype was observed in our 3xTgAD mice, spending more time in the Elevated Maze test in the open arms than their control counterparts. Finding these results only at 3 months of age. In the open field test, no significant difference was observed in both groups. Moreover, the data obtained in the NORT test indicate that the animals performed the test well in all temporal stages in the first familiarization test. However, when performing the second novel object recognition test, our 3xTgAd mice, aged 9 to 15 months, showed a decreased discrimination index compared to controls. In the results of the Three Chamber that measures social memory, we have obtained that in the socialization test the control mice spent more time with the conspecific than with the object, which is expected, however, 3xTgAD mice did not discriminate between the two or visited the object more than mice like 15-month-old mice. Regarding the social discrimination test, the mice in the control group spent more time with the new animal than with the familiar animal, but the 3xTgAD mice did not discriminate between both animals or, as in

the case of 12 and 15-month-old mice. they spent more time with the familiar mouse than with the new mouse.

The 3xTgAD model can be a good model to continue studying the mapping of the areas of the amygdala related to social memory by increasing the nuclei to study and the number of samples, since a decrease could be observed in some nuclei of the friend of the experimental animals compared to their controls and this could shed light on the pathology of AD at the level of the cognitive and emotional spheres that is affected in the patient suffering from the disease. It is known that few studies have provided us with data regarding the study of emotional memory and social recognition that is observed in this patient, and we have been able to contact that as the disease progresses these areas are more affected at the brain level, leading to the social ignorance of the subject when it comes to recognizing.

ÍNDICE

1.INTRODUCCION	3
1.1. LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	4
1.1.1. Antecedentes históricos	4
1.1.2. Epidemiología.....	7
1.1.3. Características clínicas.....	7
1.1.4. Neuropatología	8
1.1.5. Factores genéticos en la EA.....	10
1.1.6. Hipótesis clásica de la cascada amiloide	12
1.1.7. La hipótesis de la proteína Tau.....	13
1.2. TIPOS DE MEMORIA.....	15
1.2.1. Memoria a corto plazo	15
1.2.2. Memoria a largo plazo	19
1.2.3. Memoria procedimental.....	20
1.2.4. Memoria social y memoria emocional	20
1.3. EL SISTEMA LÍMBICO Y EL CIRCUITO DE LA MEMORIA.....	22
1.3.1. El sistema límbico.....	22
1.3.2. Circuito de la memoria	23
1.4. EL RECONOCIMIENTO SOCIAL	25
1.4.1. El córtex prefrontal	26
1.4.2. La corteza somatosensorial y temporal.....	28
1.4.3. La amígdala	28
1.5. MODELOS ANIMALES PARA EL ESTUDIO DE LA EA.....	35
1.5.1. Modelos monogénicos y bigénicos.....	36
1.5.2. Modelos trigénicos. El modelo 3xTgAD.....	36
1.6. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS.....	38
1.7. OBJETIVOS	40
2. MATERIALES Y MÉTODO	42
2.1. ANIMALES.....	43

2.2. PRUEBAS DE COMPORTAMIENTO	44
2.2.1. PRUEBAS DE ANSIEDAD.....	44
2.2.2. PRUEBAS COGNITIVAS	49
2.3. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS.....	54
2.3.1. Sacrificio y perfusión de los animales	54
2.3.2. Estudio inmunohistoquímico	55
2.4. ADQUISICIÓN DE IMÁGENES	56
2.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	56
3.RESULTADOS	58
3.1. OBJETIVO 1. DETERMINAR EL PATRÓN TEMPORAL DE LAS ALTERACIONES PATOLOGICAS Y CONDUCTUALES EN RATONAS 3xTgAD.....	59
3.1.1. Objetivo 1.1. Determinación del nivel de ansiedad en diferentes marcos temporales en el modelo 3xTgAD.....	59
3.1.2. Objetivo 1.2. Determinar las alteraciones en la memoria de trabajo entre los 3-15 meses de edad en el modelo 3xTgAD.....	63
3.1.3. Objetivo 1.3. Determinar las alteraciones en el reconocimiento social entre los 3-15 meses de edad.....	65
3.2. OBJETIVO 2. DETERMINAR LA FUNCIONALIDAD DE LA AMÍGDALA EN DIFERENTES ESTADIOS DE LA PATOLOGÍA TIPO ALZHEIMER EN ANIMALES 3xTg-AD.....	68
4.DISCUSION	73
4.1. DISCUSIÓN DEL MODELO UTILIZADO.....	74
4.2. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN LA VALORACIÓN ANSIOGÉNICA DEL MODELO 3XTGAD.	77
4.2.1. Evaluación de los resultados obtenidos en la prueba de laberinto elevado	78
4.2.2. Evaluación de los resultados obtenidos en la prueba de campo abierto.	79
4.3. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN LAS ALTERACIONES EN LA MEMORIA DE TRABAJO DEL MODELO 3XTGAD.....	80
4.4. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN LAS ALTERACIONES DE LA MEMORIA SOCIAL DEL MODELO 3XTGAD.....	83
4.5. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN LA ACTIVIDAD NEURONAL EN AMÍGDALA.....	86
4.6. LIMITACIONES DEL ESTUDIO	88
5. CONCLUSIONES.....	90
6. BIBLIOGRAFÍA	92

1.INTRODUCCION

1.1. LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la causa más común de demencia a nivel mundial. Se caracteriza por ser una enfermedad neurodegenerativa que presenta dos aspectos distintivos principales desde el punto de vista neuropatológico que son: los depósitos extracelulares de beta amiloide ($A\beta$), formando placas seniles y la presencia de ovillos neurofibrilares de tau hiperfosforilada (NFT). Los principales síntomas clínicos son deterioro cognitivo, emocional y conductual (Weller & Budson, 2018). Atendiendo al comienzo de la enfermedad se puede clasificar en EA de inicio temprano (EOAD) que se inicia aproximadamente a los 45 años con una historia genética familiar y, la más frecuente, EA de inicio tardío (LOAD) cuya edad de debut se encuentra entre los 65-75 años y que representa el 95 % de los pacientes que la padecen (Masters et al., 2015).

1.1.1. Antecedentes históricos

En 1907, Aloysius *Alois* Alzheimer, publicó su obra seminal en la que describe por primera vez los síntomas de la enfermedad que posteriormente llevó su nombre. Esta obra se deriva de los hallazgos neuropsicológicos y neuropatológicos, de su paciente Auguste Deter, que se encontraba en el asilo psiquiátrico estatal de Frankfurt, en Alemania. La paciente, de 51 años, ingresó en 1901 aquejada de una acuciante celotipia, con rápida pérdida de memoria, desorientación temporal y espacial, delirios y alucinaciones (Stelzmann et al., 1995). Cuando Auguste falleció, cuatro años y medio después de la aparición de los síntomas, utilizó la técnica de tinción de plata de Bielschowsky para realizar un estudio neuropatológico. La autopsia mostró un cerebro uniformemente atrófico con cambios arterioescleróticos. El análisis histológico reveló numerosas

fibrillas intra y extraneuronales, la presencia de ovillos neurofibrilares ocupando el espacio de neuronas ausentes y abundantes “focos miliares” derivados de la deposición de una sustancia especial en la corteza, posteriormente esta sustancia fue identificada como beta-amiloide. A pesar de que, derivado de estos hallazgos y la aparición de casos semejantes, Alois postuló la existencia de una novedosa enfermedad, fue su mentor, Emil Kraepelin, quien bautizó la enfermedad neurodegenerativa con el epónimo hoy conocido en la edición de 1910 de su famosa obra “Psiquiatría: Un libro de texto para estudiantes y residentes” (Kraepelin, 1910).

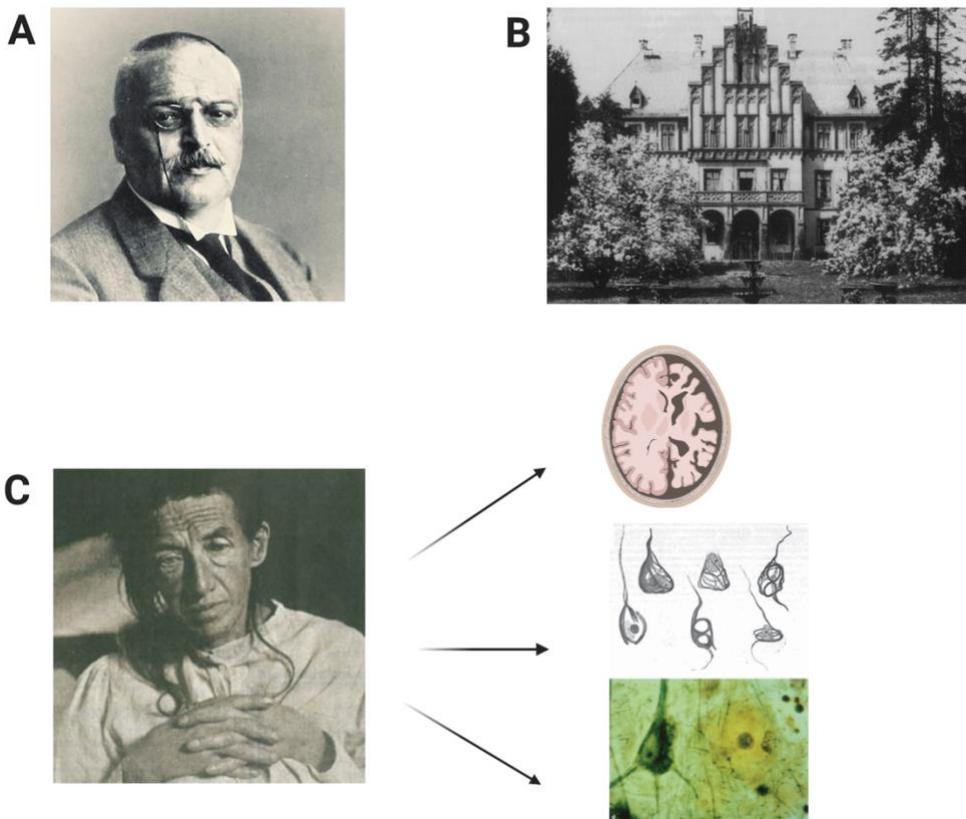


Figura 1. Marco histórico de la enfermedad de Alzheimer. La figura representa el correlato histórico de la EA. De esta manera se observa la fotografía de Alois Alzheimer, nacido en Marketbreit (14 junio 1864, Alemania) y reconocido por describir la enfermedad que se lleva su nombre (A), *The Municipal Asylum for the Insane and Epileptic* en Frankfurt, donde se diagnosticó por primera vez la demencia tipo Alzheimer en 1907 (B) y una fotografía

de Auguste Deter, primera paciente documentada que presentó las características anatomopatológicas de la EA: i) atrofia cerebral, ii) NFT y los depósitos amiloides característicos de la enfermedad descrita por Alois Alzheimer (C).

Durante el siglo pasado se avanzó en el conocimiento de la EA, así se demostró que la principal característica de la EA presenil era un déficit en la memoria, derivada de dos factores, una pérdida anormalmente rápida de la información almacenada a corto plazo y una dificultad de transferencia entre el almacenamiento a corto y a largo plazo (E. Miller, 1971, 1973), Estas alteraciones cognitivas correlacionaban con alteraciones estructurales a nivel del lóbulo temporal medial específicamente el hipocampo y la corteza entorrinal (Hyman et al., 1984). Si nos atenemos a los criterios del diagnóstico clínico para la EA, estos se especificaron por primera vez en el Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales (DSM-III, 1980) y se han ido actualizando progresivamente (DSM-IV, 1997; DSM-V, 2013). Sin embargo, los criterios más utilizados fueron los derivados de DSM-4 y de la Clasificación Internacional de Enfermedades, décima edición (CIE- 10), que son parte de la clasificación internacional de enfermedades publicada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (OMS, 1992). En dichos criterios, se establece que la demencia se caracteriza por un deterioro en la capacidad de aprender nueva información o recordar la previamente aprendida) concomitante con otras alteraciones cognitivas como apraxia, agnosia, afasia, apraxia o alteración de las funciones ejecutivas que afectan a la actividad social y laboral.

En las últimas décadas se ha alcanzado un entendimiento básico, en cuanto a los principales rasgos identificativos de la enfermedad, a partir de la unión de dos líneas de investigación independientes. Primero, el estudio molecular de los depósitos llevó a la identificación de sus principales componentes. Segundo, el estudio de formas raras y hereditarias de la EA dio como resultado el descubrimiento de los defectos genéticos causantes. En la mayoría de los casos, los genes defectuosos codifican los principales componentes de las lesiones patológicas o los factores que

cambian sus niveles. De ello se desprende que una propiedad tóxica de las proteínas que componen los depósitos fibrilares subyace en los casos de enfermedades hereditarias. Una propiedad tóxica similar también puede causar las formas esporádicas, mucho más frecuentes, de la EA.

1.1.2. Epidemiología

A día de hoy se estima en 46,000,000 millones el número de personas afectadas por EA a nivel mundial Según la OMS, para el año 2030 y 2050, 74,7 millones y 114 millones de personas sufrirán de EA, respectivamente (Prince et al., 2015, 2016). El costo estimado de la atención de estas personas es de alrededor de 2 billones de dólares Según un estudio de meta análisis realizado en 2016, para los individuos mayores de 60 años, la prevalencia general de la EA es de 40,19% en todo el mundo (Fiest et al., 2016). El Informe Mundial sobre el Alzheimer de 2015 manifestó que existían 46,8 millones de personas que vivían con demencia en todo el mundo, donde el número de casos previstos casi se duplicaba cada 20 años (Reitz & Mayeux, 2014).

En la población española, la prevalencia de la demencia en la población mayor de 65 años se estima entre el 4% y el 9%. Este porcentaje es mayor en mujeres en todos los grupos de edad, siendo la EA la causa más frecuente de demencia (50-70% de los casos) (Villarejo Galende et al., 2017).

1.1.3. Características clínicas

En cuanto a la clasificación de la EA según las características clínicas podemos observar tres amplios grupos fenotípicos: i) los que presentan alteraciones a nivel del lóbulo frontal, junto con las alteraciones corticales posteriores, con una temprana edad de debut de la enfermedad y fuerte asociación familiar no relacionado con APOE ϵ 4 ii) los que presentan alteraciones en el hemisferio posterior (en lóbulo temporoparietal, parietal y occipital), con fuerte predominancia del género femenino, asociados con una mediana edad y baja incidencia familiar y iii) los que manifiestan

síntomas asociados con una disfunción del lóbulo temporal, sin sesgo de género, avanzada edad y alta incidencia familiar de demencia asociada con APOEε4 (Snowden et al., 2007).

En general, el patrón clínico típico del paciente con EA comienza con una disfunción de la memoria episódica y luego progresa a otros dominios cognitivos (Dubois et al., 2007a). Sin embargo, en ocasiones se han descrito presentaciones atípicas, sin deterioro de la memoria episódica al inicio (Galton et al., 2000). Estas manifestaciones clínicas atípicas son más frecuentes en el caso de la EOAD, en las que alrededor de 1/3 de los pacientes presentan deterioro visual, ejecutivo, conductual o del lenguaje (Balasa et al., 2011). Así mismo, tanto en la EA como en otras demencias los síntomas neuropsiquiátricos también se encuentran presentes, estando su gravedad modulada por la severidad de los déficit cognitivos (Petrovic et al., 2007).

De especial interés para la presente tesis es el hecho de la existencia de alteraciones emocionales en los pacientes con EA en comparación con el envejecimiento normal (Brueckner & Moritz, 2009), siendo especialmente acuciante el déficit en los recuerdos y asociaciones emocionales en estos pacientes (Meléndez et al., 2019).

1.1.4. Neuropatología

Como se ha comentado anteriormente, las dos lesiones anatomopatológicas principales halladas en los cerebros de pacientes con EA son la presencia de placas seniles compuestas principalmente por Aβ y los NFT intracelulares. Existen múltiples subtipos de placas como las difusas, neuríticas y compacta (Castellani et al., 2010). El mal procesamiento de la proteína precursora amiloide (del inglés “amyloid precursor protein”, (APP)) origina los acúmulos de beta amiloide que se depositan como placas seniles (Masters & Selkoe, 2012; Müller et al., 2017). Los NFT son filamentos hiperfosforilados intraneurales compuestos principalmente por proteína tau (H Braak & Braak,

1997; Crews & Masliah, 2010). De igual manera se han descrito lesiones intrahipocampales compuestas principalmente por cuerpos de Hirano y degeneración vacuolar granulosa, asociadas con pérdida neuronal y afectación del neuropilo (Scheff et al., 1993).

Desde el punto de vista neuropatológico se puede clasificar la EA en seis etapas o estadios, conocidos como estadios de Braak, atendiendo a su seminal estudio en el que empleando la tinción de plata clásica describieron la distribución de los NFT (H. Braak & Braak, 1991). La distribución de los NFTs sigue un proceso de propagación “tipo prionide” en el se observan secuencialmente en: i) región transentorrinal (estadios I y II), ii) región límbica (estadios III y IV) y áreas isocorticales (estadios V y VI) (Figura 2) (H. Braak & Braak, 1991; Heiko Braak et al., 2006)

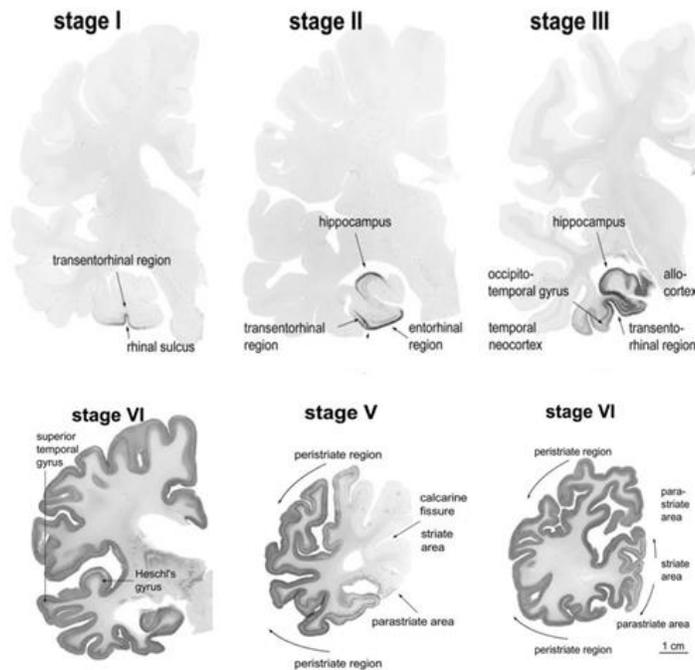


Figura 2. Estadios de Braak I-VI. Hemisferios coronales de cerebros humanos que muestran los estadios de Braak donde se observa como progresa la acumulación de proteína tau hiperfosforilada mediante inmunotinción para fosfo-tau. Tomado de (Heiko Braak et al., 2006).

Según avanza la enfermedad, se observa una progresiva atrofia cerebral en el área entorrinal, la amígdala, el hipocampo y las regiones asociativas del neocórtex (Calderon-Garcidueñas & Duyckaerts, 2017; Vallar, 2017).

La cronología de la pérdida neuronal tiene un doble componente: localmente, es un acontecimiento tardío, que se produce después de la acumulación de A β y la agregación de tau; regionalmente, afecta selectivamente a las áreas corticales y subcorticales comúnmente afectadas por la patología de tau (Heiko Braak et al., 2006; J. L. Price et al., 2001). En la capa II de la corteza entorrinal, afectada tempranamente, la pérdida puede alcanzar el 90% incluso en los casos moderadamente graves; mientras que en áreas del neocórtex la pérdida es más tardía y menos marcada (Calderon-Garcidueñas & Duyckaerts, 2017; Grignon et al., 1998). Otras áreas afectadas son el bulbo olfatorio, el núcleo basal de Meynert, la parte rostral de locus cerúleo y el núcleo del rafe (Castellani et al., 2010; Duyckaerts et al., 2009; Gowrishankar et al., 2015). La causa de la pérdida neuronal sigue siendo objeto de controversia: la presencia de ovillos difusos indica que la muerte neuronal está asociada, pero también posiblemente vinculada, a la presencia de NFT.

La activación del sistema inmunológico en la EA puede representar un papel semejante al de un marcapasos, perpetuando y acelerando el curso de la enfermedad; aunque, a día de hoy, no se piensa que sea el desencadenante de la enfermedad, no puede excluirse que las acciones inmunológicas, al menos en parte, puedan también tener un papel perjudicial en el inicio de la misma (Heppner et al., 2015).

1.1.5. Factores genéticos en la EA

Aunque solo el 1% de los casos de EA se pueden atribuir a factores genéticos, de ellos los únicos genes determinantes para el desarrollo de la EA es la presencia de mutaciones en uno de estos tres

genes: presenilina 1 (PSEN1) localizado en el cromosoma 14q24.3, presenilina 2 (PSEN2) localizado en el cromosoma 1q31-q42. y la proteína precursora de amiloide (APP) localizado en el cromosoma 21q21 (Bateman et al., 2010). El mayor riesgo de padecer EA que presentan los pacientes con síndrome de Down, se explicaría por tanto por encontrarse ambas patologías relacionadas con el mismo cromosoma, estando este riesgo conferido por la presencia de tres copias del gen que codifica la APP (Wiseman et al., 2015).

Se confirmó también un cuarto gen involucrado, la apolipoproteína (APOE), que es el mayor factor de riesgo para la EA tardía. Ubicado en el cromosoma 19q13.2, este gen tiene tres variantes $\epsilon 2$, $\epsilon 3$, and $\epsilon 4$ (Corder et al., 1993; Pericak-Vance et al., 1991). La variante APOE $\epsilon 4$ es reconocida como el factor de riesgo más fuerte para la EA esporádica, los portadores heterocigotos triplican el riesgo de padecer EA, mientras que los homocigotos lo aumentan de 10 a 12 veces (Corder et al., 1993). Además, la dosis de APOE $\epsilon 4$ está negativamente correlacionada con la edad de aparición, mientras que APOE $\epsilon 2$ disminuye el riesgo de la EA y se correlaciona positivamente con la edad de inicio (Strittmatter et al., 1993)

Tras la identificación de APOE $\epsilon 4$, se han realizado varios estudios de GWAS que han mostrado numerosos nuevos loci genéticos de riesgo de la EA. Estos loci de riesgo, hoy en día se han identificado 40, pueden participar en varias vías patógenas de la EA, tales como la respuesta inmune, el metabolismo lipídico o la integridad sináptica (Andrews et al., 2020; Bertram et al., 2007; Shao et al., 2017).

Dado que los cerebros post mortem de pacientes con EA, mostraban unos depósitos característicos tanto intracelulares, NFT, como extracelulares, placas seniles, desde el siglo pasado se convirtieron en los principales candidatos causantes de la patología de la enfermedad.

1.1.6. Hipótesis clásica de la cascada amiloide

En el brazo largo del cromosoma 21 se localiza el gen de la APP, que codifica para la proteína precursora de amiloide, una proteína transmembrana cuyo procesamiento da lugar al A β . La APP es escindida sucesivamente por la enzima β -secretasa (BACE1) y por la γ -secretasa, donde PS1 y PS2 tienen su sitio catalítico. BACE1 rompe la APP en el extremo N de la secuencia A β , liberando la APP- β secretada y el fragmento C99 unido a la membrana (Vassar et al., 1999). Tras la división por el BACE1, el complejo de la γ -secretasa se une al fragmento C99 dividiéndolo en dos partes y liberando el fragmento C-terminal (CTF) y un péptido A β . Este péptido presenta una longitud variable, entre 36-43 aminoácidos, siendo las formas más frecuentes aquellas constituidas por 40 (A β 1-40) o 42 (A β 1-42) aminoácidos (Haass et al., 2012) y la forma menos habitual de 43 aminoácidos (A β 1-43), la más citotóxica (Burnouf et al., 2015; Saito et al., 2011). Entre las formas más comunes la A β 42 es menos soluble y por tanto más propensa a agregarse (D. . Walsh & D.J, 2007),. Por otra parte, la APP puede ser escindida por otras enzimas tales como la α - o la η -secretasa, en cuyo caso no se forma la proteína A β . La función que desempeña esta proteína A β todavía no ha sido dilucidada.

Este A β se oligomeriza difundiendo en las hendiduras sinápticas e interrumpiendo la señalización siendo esta forma oligómera la neurotóxica. (Crews & Masliah, 2010). Posteriormente, los oligómeros se agrupan formando fibrillas amiloides que se agregan constituyendo las PS. En este sentido, se ha demostrado que este A β , precede a la formación de los ovillos, de hecho, se postula que induce la formación de estos. A β inicia la activación de quinasas, que desencadenan la hiperfosforilación de la proteína tau y por tanto la formación de

NFT insolubles. Estos depósitos de NFT generan una inflamación local que deriva en un ambiente neurotóxico por el reclutamiento de células microgliales alrededor de las PS y en la proximidad de las neuronas con NFT (Galea et al., 2012; Guo & Lee, 2014; Tiwari et al., 2019).

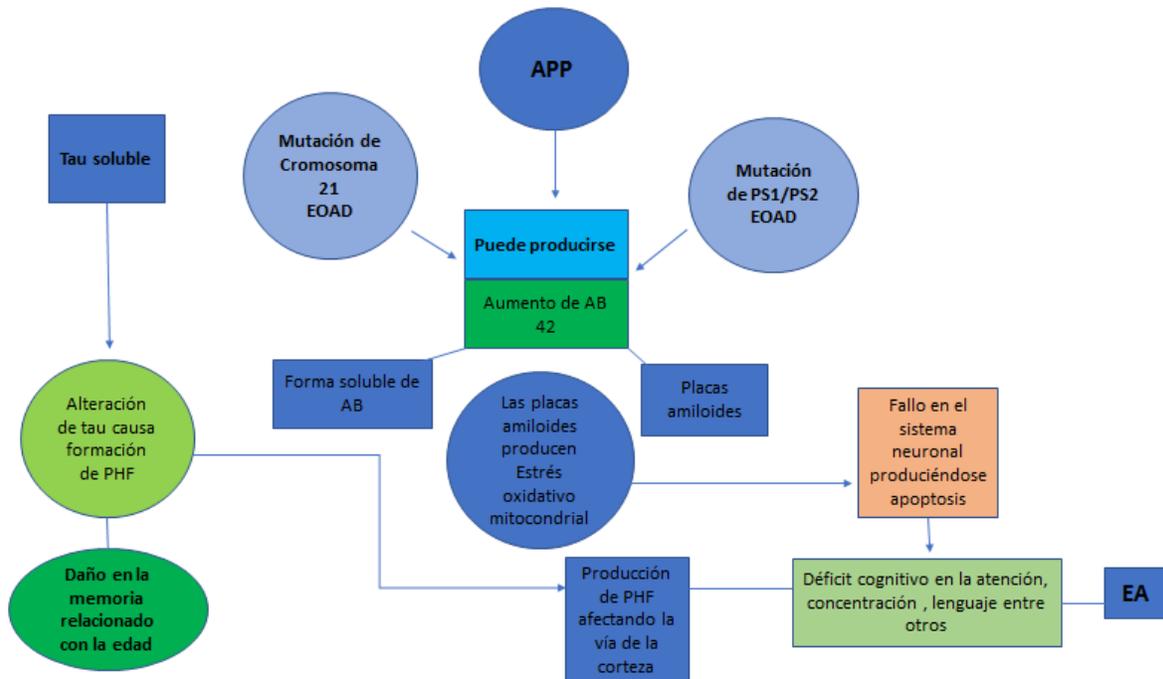


Figura 3. Ruta de degeneración postulada en la enfermedad de EA. De acuerdo con esta hipótesis, el aumento de beta amiloide es la que da lugar a todos los daños ocurridos como la disfunción sináptica y la muerte neuronal en el paciente que padece de EA.

1.1.7. La hipótesis de la proteína Tau

El otro rasgo anatomopatológico característico de la EA es la presencia de NFT descritos por primera vez a mediados del siglo pasado (Kidd, 1963). Sin embargo, la composición de estos

filamentos helicoidales emparejados, no fue dilucidada hasta dos décadas más tarde, cuando se demostró la presencia de la proteína tau como el componente principal proteico de esta estructura (Arendt, 2009). Tau es una fosfoproteína asociada a microtúbulos (MAP), codificada por el gen MAPT situado en el cromosoma 17q21, y por tanto esencial para la estabilización de estos (Weingarten et al., 1975) desempeñando una importante función en la consolidación estructural del citoesqueleto neuronal y el mantenimiento del transporte axonal y de las vías de señalización (Kosik K.S, 1993; Tudorică et al., 2017).

El principal componente de los neurotúbulos es la tubulina (Kosik K.S, 1993), y su polimerización y despolimerización está regulada por la acción de quinasas y fosfatasa de sus proteínas asociadas (Mandelkow et al., 1995), como tau que regula la polimerización de los neurotúbulos a los que se une por un dominio formado por tres o cuatro repeticiones de secuencias. Hay isoformas tau de 3 o 4 repeticiones (3R o 4R). En la EA, ambas isoformas se acumulan y son hiperfosforiladas (Calderon-Garcidueñas & Duyckaerts, 2017)

La función biológica de tau depende pues de su estado fosforilado, al fosforilarse se desprende de los neurotúbulos que se desestabilizan y despolimerizan. Las principales proteinkininas involucradas en la fosforilación anormal de tau son: las dependientes de ciclina (Cdk5/p35) y la de glucógeno sintasa (GSK3 β) (Ballatore et al., 2007; Gendreau & Hall, 2013). La proteína tau se halla principalmente a nivel axonal, pero igualmente se observa a nivel sináptico, relacionada con la regulación del tráfico de receptores de glutamato. Al exponerse la neurona a los oligómeros de A β , tau se acumula en el compartimento somatodendrítico (Zempel et al., 2010). De igual manera la acumulación de tau fosforilada en las espinas dendríticas interfiere negativamente con la plasticidad sináptica (Frandemiche et al., 2014).

Así mismo, la presencia de tau fosforilada induce alteraciones en la fosforilación oxidativa (Su et al., 2010) lo que deriva en déficits funcionales a nivel mitocondrial y por tanto constituyen un factor importante en la neurodegeneración (Tudorică et al., 2017).

1.2. TIPOS DE MEMORIA

El deterioro de la memoria es una característica central y definitoria de la EA (Dubois et al., 2007b). Si bien se ha documentado ampliamente la disfunción de la memoria a largo plazo y episódica, se ha prestado mucha menos atención a los déficits de la memoria a corto plazo de la enfermedad. De igual manera, dada la heterogeneidad en la sintomatología clínica de la EA, se ha sugerido una variación fenotípica en las alteraciones de la memoria con las que cursa (Stopford et al., 2007). Las alteraciones detectadas en la memoria de trabajo, pero no en la memoria episódica, en pacientes con EA leve-moderada están asociadas a la disfunción del lenguaje y la visión espacial, lo que sugiere un papel contributivo de la neocorteza temporoparietal (Stopford et al., 2007, 2008).

1.2.1. Memoria a corto plazo

La memoria de corto plazo (*short term memory*, STM), también denominada almacenamiento de corto plazo, o memoria primaria o activa, engloba los diferentes sistemas de memoria que intervienen en la retención de fragmentos de información (trozos de memoria) durante un tiempo relativamente corto (por lo general hasta 30 segundos). Las áreas cerebrales implicadas en la STM son las frontales premotoras y parietal posterior que se encuentran en el hemisferio izquierdo del cerebro y las áreas del hemisferio derecho relacionadas con la STM espacial. La STM ayuda en el proceso de aprendizaje de nueva información, producción y comprensión del habla (Courtney,

2010; Vallar, 2017). La capacidad de retener información durante cortos períodos de tiempo desempeña un papel fundamental en casi todas las tareas cognitivas. En este sentido, la STM se asemejaría a un "bloc de notas" para la recuperación temporal de un número limitado de datos (ej. en el dominio verbal se postula la recuperación de 7 ± 2 elementos) que provienen del registro sensorial y que serán procesados a través de la atención y el reconocimiento (Casella & Al Khalili, 2020).

Estudios recientes sugieren que la STM surge cuando la atención va dirigida a señales de representación sensoriales que están almacenadas en estructuras específicas del cerebro relacionadas con el almacenamiento, que va de lo sensorial a lo cognitivo (Jolicoeur et al., 2015). La STM se interrumpe de forma fácil hasta que se guarda en la memoria a largo plazo, siendo una memoria frágil a cualquier interferencia, con una duración de 15 a 30 segundos (Michael-Titus et al., 2010; Morgano, 2005).

Algunos autores postulan que la STM es un componente de la memoria de trabajo (*working memory*, WM), el sistema cognitivo que subyace a nuestra capacidad de mantener temporalmente, así como manipular la información cuando ya no es accesible en el entorno. Sin embargo, otros conciben la STM y la WM como dos entidades distintas (Casella & Al Khalili, 2020). STM, de hecho, sería un conjunto de sistemas de almacenamiento, mientras que la WM indica las operaciones cognitivas y las funciones ejecutivas asociadas con la organización y manipulación de la información almacenada (E. K. Miller et al., 2018). A pesar de la controversia de criterios ambos términos STM y WM se utilizan a menudo indistintamente en la bibliografía.

Finalmente, también habría que distinguir la STM de la "memoria sensorial" (*sensorial memory*, SM), reflejada en las memorias eco acústicas y/o visuales icónicas, que tienen una duración más

corta (fracción de segundo) que la STM y reflejan la sensación original, o percepción, del estímulo. En otras palabras, la SM es un concepto específico de la modalidad de presentación del estímulo. Esta información sensorial "en bruto" se somete a un procesamiento y cuando se convierte en STM se expresa en un formato diferente del que se percibe inicialmente.

Al principio se postuló que existía un déficit general en el componente ejecutivo central de WM en los pacientes con EA más que en el mantenimiento (Baddeley et al., 1991). Sin embargo, trabajos más recientes han hecho hincapié en una reducción de la capacidad de WM, destacando una dificultad en el almacenamiento vinculada a la atrofia en las regiones temporoparietales más que en regiones frontales (Kobylecki et al., 2018). Recientes estudios han demostrado que las predicciones de la STM se encuentran preservadas en los pacientes con EA (Bertrand et al., 2019).

Recientemente se ha sugerido que los déficits de la STM podrían ser un distintivo de la EA (Zokaei et al., 2020). En el estudio de (Liang et al., 2016), sobre la STM en pacientes con EA familiar en comparación con individuos sanos utilizando una batería neuropsicológica y resonancia magnética estructural encontraron que en general los que tenían la EA familiar, obtuvieron puntuaciones más bajas que los controles y mostraron una mayor confusión de la identidad y ubicación del objeto frente a los controles. Así mismo, Parra y cols., han realizado numerosos estudios en este sentido, en 2009, estudiando pacientes con EA y controles, utilizando las matrices visuales de objetos, colores, y objetos sueltos, encontraron que los pacientes con EA recordaban peor los objetos asociados con colores en comparación con el recuerdo de las características únicas no ligadas. En el segundo experimento con pacientes con EA y adultos mayores sanos, por medio del recuerdo de 8 elementos evaluaron las características únicas de cada uno y se encontró deterioro en los pacientes con EA en relación con los controles sanos (Parra et al., 2009). De igual forma, también este mismo grupo, evaluó el déficit visual en relación con la STM, en i) pacientes con EA Familiar,

ii) portadores de la mutación de la enfermedad, pero que no cumplían con los criterios del diagnóstico de la EA y iii) en familiares sanos, observándose en que los pacientes con la EA familiar y los del grupo de los portadores obtenían peores puntuaciones que los controles en la evaluación de la prueba neuropsicológica (Parra et al., 2010).

Finalmente, también realizaron un estudio en el cual se analizaron las imágenes de resonancia magnética con tensor de difusión para estudiar la estructura de la sustancia blanca en relación con la STM. Para ello, en pacientes con EA familiar, portadores asintomáticos y controles, se evaluó la STM con dos pantallas consecutivas que mostraban matrices de forma o de forma y color. Los resultados demostraron que los controles obtuvieron mejor puntuación que los que padecían la EA familiar, mientras que los asintomáticos solo se diferenciaron de los controles en la tarea de unión de vinculación (Parra et al., 2015).

En cuanto a las investigaciones realizadas para estudiar la STM en animales, se ha demostrado que ratones macho y hembra 3xTgAD de 6,5 meses de edad, tenían déficit en el aprendizaje y la memoria en comparación con los salvajes en la prueba de laberinto de Barnes, sin embargo, obtuvieron un mejor desempeño en la prueba de laberinto en Y en comparación con los salvajes (Stover et al., 2015). Empleando esta misma cepa murina en el laberinto de agua de Morris (MWM) se ha observado que los ratones 3xtg-AD, entre 2 y 15 meses de edad presentan un déficit en la WM y de referencia en comparación con los controles, (Stevens & Brown, 2015). Finalmente Igualmente (Clark et al., 2015) usando el modelo 3xTgAD y controles, evaluaron la memoria de trabajo espacial por medio del laberinto radial de 8 brazos, y hallaron que los ratones 3xTgAD a los 3 meses de edad presentaban un significativo déficit en la WS espacial, que sorprendentemente era igual a la presentada en estos ratones a los de 8 meses de edad, en comparación con los controles de la misma edad.

1.2.2. Memoria a largo plazo

La memoria a largo plazo (LTM) consiste en un amplio depósito de información de registros de eventos ya pasados, se trata por tanto de un conjunto de recuerdos almacenados por un largo tiempo (Cowan, 2009). La LTM contiene recuerdos sobre la experiencia de la vida, de meses hasta años, siendo más estable y duradera que la STM (Sandi et al., 2001). La información recogida en el almacenamiento de la LTM consiste en memorias para la realización de acciones o habilidades (es decir, memorias procedimentales, "saber cómo") y memorias de hechos, reglas, conceptos y eventos (es decir, memorias declarativas, "saber eso").

La memoria procedimental implica ciertas actividades que aprendemos practicando y exponiéndonos repetidamente a una serie de salidas motrices (por ejemplo, montar en bicicleta o conducir un coche).

La memoria declarativa incluye la memoria semántica y la memoria episódica. La primera se refiere al conocimiento amplio de hechos, reglas, conceptos y proposiciones ("conocimiento general"), la segunda se relaciona con los acontecimientos personales y experimentados y los contextos en que se produjeron ("recuerdo personal") (Almaraz-Espinoza & Grider, 2020).

La memoria se consolida de las memorias a corto plazo a las memorias a largo plazo, principalmente en el hipocampo y se almacena en toda la corteza. Estas estructuras interconectadas ayudan a interpretar los estímulos para actuar en consecuencia, ya sea recuperando viejos recuerdos para tomar decisiones en base a experiencias previas o almacenándolos para que podamos aprender de ellos.

En relación con los estudios de LTM en pacientes con EA, estudios de fluidez verbal o semántica categorial han demostrado que existe una pobre fluidez verbal en los adultos mayores con EA

comparados con los individuos sanos (Saúl et al., 2010). De igual manera, los pacientes con EA presentan una mejor conservación de los recuerdos pasados remotos, memoria autobiográfica, que de los recuerdos más recientes (Kirk & Bertntsen, 2018).

1.2.3. Memoria procedimental

La memoria procedimental, no declarativa y a menudo implícita, se define como la capacidad de adquirir, mediante la práctica y el ensayo-error, habilidades cognitivas y conductuales que posteriormente se realizan de forma automática. La memoria procedimental se puede dividir en motora, perceptual y cognitiva (Mochizuki-Kawai, 2008). En nuestra vida diaria hacemos uso de ella cuando caminamos, conducimos un coche, usamos el mando a distancia de la televisión, tocamos un instrumento, montamos en bicicleta o leemos.

Desde el punto de vista neuroanatómico, las principales áreas implicadas son los ganglios basales, el cerebelo y el área motora suplementaria del córtex (Shrivastava et al., 2019). Por ello, los principales déficits en este tipo de memoria se registran con mayor frecuencia en pacientes con la enfermedad de Parkinson o de Huntington (Matthews, 2015).

1.2.4. Memoria social y memoria emocional

1.2.4.1. Memoria y reconocimiento sociales

La interacción del ser humano con la sociedad, base de la supervivencia del individuo, se basa en un complejo circuito en el que se engloban procesos cognitivos y de reconocimiento de otros semejantes. Este circuito determinará como interrelacionamos con otras personas, nuestra conducta sexual o agresiva, nuestra capacidad cooperativa o nuestro comportamiento social.

En el caso de los animales el reconocimiento social es primordial en su supervivencia, mediante la impronta de recuerdos episódicos que le permiten tanto cohabitar con individuos de su grupo (Lai, 2005), como reconocer el comportamiento cooperativo, agresivo o evasivo de otros animales (Okuyama, 2018). recuerdos episódicos se componen de diferentes informaciones como son la espacial (donde), temporal (cuando), de eventos (que) y la social (quien) (Hitti & Siegelbaum, 2014; Kitamura, 2017) El reconocimiento social, por tanto, en un animal da a conocer su capacidad para aprender y recordar al otro (Gao et al., 2009). En el caso de los roedores, el grado de memoria social se puede evaluar calculando el tiempo total de la interacción con los ratones nuevos en comparación con ratones familiares realizando la discriminación social en ellos (Perna & Engelman, 2016).

1.2.4.2. Memoria emocional

La memoria emocional es un tipo de memoria que almacena la información que tiene que ver con el aprendizaje implícito y el significado emocional de los eventos. En estudios de laboratorio en el aprendizaje de modera con el estudio del comportamiento clásico (LeDoux, 1993). El área del cerebro involucrada en la memoria emocional es la amígdala y las estructuras que se encuentran conectadas o que proyectan a ella, como hipocampo (LeDoux, 1993; Suzuki, 2009). Los recuerdos de las situaciones que evocan emociones negativas son persistentes (Wagner et al., 2006). El procedimiento de los eventos emocionales funciona como un sistema selectivo, eligiendo los hechos más relevantes de mayor significado para nosotros, que estarían guardados de forma duradera en nuestra memoria (Rodríguez et al., 2004).

En relación con la EA, estudios que evaluaron la memoria de reconocimiento de caras en pacientes con EA, con deterioro cognitivo leve (DCL) y adultos sanos empleando la escala de Wechsler III,

señalan que los pacientes con EA presentan un déficit significativo en este tipo de memoria en comparación con los que padecían DCL y los adultos sanos (Seelye et al., 2009).

1.3. EL SISTEMA LÍMBICO Y EL CIRCUITO DE LA MEMORIA.

1.3.1. El sistema límbico

El sistema límbico está constituido por diferentes estructuras que intervienen en funciones tan complejas e interrelacionadas como las interacciones sociales, el aprendizaje y la memoria. Está compuesto jerárquicamente por dos niveles estructurales y funcionales.

El primer nivel engloba al lóbulo límbico, en el que se agrupan estructuras corticales de la porción más medial (o limbo, de ahí su nombre) del hemisferio, inmediatamente adyacente al cuerpo calloso y al diencéfalo. Brevemente estas estructuras, localizadas desde la lámina terminal en dirección caudal, son: i) área subcallosa, ii) giro cingular, iii) istmo del giro cingular, iv) giro parahipocampal y vi) el uncus. En este lóbulo límbico también hallamos a la formación del hipocampo. En el segundo nivel encontraríamos estructuras del sistema límbico junto con núcleos (n. septales, n. accumbens y ns. amigdalinos entre otros) y tractos subcorticales.

La formación del hipocampo engloba a tres estructuras principalmente: i) el hipocampo propiamente dicho, ii) el giro dentado y iii) subículo,

El giro dentado y el hipocampo están constituidos por tres capas (allócortex), la i) la más externa es la capa molecular, ii) la capa media, o capa granular en giro dentado o capa piramidal (hipocampo) y iii) la capa más interna, capa multiforme en giro dentado y capa oriens en hipocampo. A su vez de según su citoarquitectura el hipocampo se puede dividir en cuatro regiones

(CA1-CA4). La capa CA1 se encuentra entre el hipocampo y el subículo. La capa CA2 y la CA3 en el interior del hipocampo y la CA4 entre el hipocampo y el giro dentado.

El subículo se localiza entre el allocórtex (tres capas) del hipocampo y el páleocórtex (cinco capas) del giro parahipocampal.

1.3.2. Circuito de la memoria

El funcionamiento de la memoria se asocia a tres áreas principales que son: los lóbulos temporales, el cerebro basal anterior y el diencefalo (Bauer et al., 2003). El lóbulo temporal medial y el diencefalo se encargan de establecer nuevos recuerdos declarativos, que luego se almacenan en áreas específicas de la corteza cerebral. El lóbulo frontal y los ganglios basales son relevantes en la memoria declarativa, que se asocia más al razonamiento. Las formas no declarativas de la memoria se asocian a su vez a estructuras como el cerebelo, los ganglios basales y la corteza cerebral (Poldrack & Gabrieli, 1997). Se considera que los recuerdos se almacenan primero en la corteza hipocampal-entorrinal (HPC-EC) (memoria reciente) y más adelante se van consolidando en la neocorteza (memoria remota) (Buzsáki, 1996; Preston & Eichenbaum, 2013).

Desde el célebre caso del paciente Henry Gustav Molaison (H.M.) en el año 1957, que, tras serle extirpado el hipocampo y estructuras cercanas al lóbulo temporal, perdió la capacidad de formar nuevos recuerdos, estas áreas cerebrales se han postulado como las responsables de nuestros recuerdos. A continuación, se procederá a describir las áreas anatómicas más relevantes en el procesamiento de la memoria.

Al lóbulo temporal medial (LTM) se le atribuye diferentes áreas que ayudan a una mejor retención de la memoria, las estructuras que forman parte del LTM son: el hipocampo, la corteza entorrinal

(CE), la corteza perirrinal (CP) y las cortezas parahipocampales (CPH) (Squire & Zola-Morgan, 1991).

Como se mencionó anteriormente, el hipocampo es una estructura primordial en el procesamiento de la memoria (Knierim, 2015). Lesiones en el hipocampo inducen déficits en la memoria espacial de roedores evaluada mediante la prueba de Morris (Morris Water Maze, MWM) (Knierim, 2015; Nunez, 2008). Asimismo, el hipocampo se puede dividir en CA1, CA3 y giro dentado (Knierim & Neunuebel, 2016). La formación hipocampal está compuesta por las áreas CA1, CA2, CA3 y CA4 (Cuerno de Ammon), el giro dentado y el subículo (Witter et al., 2000).

Por otro lado, la CE es un área del cerebro que rodea al hipocampo, como un centro de red cortical que contribuye al mantenimiento de la memoria (Suzuki & Amaral, 2004). De igual forma (Takehara-Nishiuchi, 2014), señala que esta área se encarga de lograr la asociación durante la recuperación de nuevos recuerdos, por medio de las regiones neocorticales sensoriales dando acceso al hipocampo. Sin embargo, se cree que la CP está relacionada con la familiaridad con el contenido de algo que no se conoce antes nada de ello. En cuanto a la memoria espacial se considera que es mediada por la CPH (Shelton & Gabrieli, 2002).

Otra área implicada en la memoria es el sistema límbico (Vogt, 2019), partiendo de las ideas de Papez 1937, McLean describió el termino de sistema límbico considerando otras estructuras importantes en la codificación de la memoria con la implicación de las emociones en el proceso del recuerdo (MacLean, 1952),.

1.4. EL RECONOCIMIENTO SOCIAL

Los circuitos neuronales que regulan los comportamientos sociales se ensamblan de acuerdo con al menos dos principios organizativos. Una sola región del cerebro puede coordinar varios comportamientos sociales diferentes, como la agresión, la reproducción, la crianza de los hijos y la sociabilidad, así como comportamientos no sociales, como la alimentación y el aseo personal. Al mismo tiempo, comportamientos tan complejos como las interacciones sociales son orquestados por una amplia red de regiones en todo el cerebro (Raam & Hong, 2021)

El reconocimiento social es el sistema especializado en percibir y procesar señales sociales que sean relevantes para el individuo, de manera que se puedan integrar con su propio estado fisiológico interno y producir una respuesta conductual específica para cada situación. Esta respuesta, por tanto, estará modulada por factores genéticos, epigenéticos y ambientales (Hofmann et al., 2014). De igual manera, esta respuesta ha de ser dinámica y adaptativa, ya que el contexto social se modifica constantemente, actualizándose con nueva información. Alteraciones en este reconocimiento social, y por tanto en la respuesta del individuo frente a los cambios en el ambiente, derivan en importantes implicaciones para la salud humana.

Las estructuras cerebrales implicadas en estos procesos cognitivos sociales, identificadas a partir del estudio de cerebros de pacientes con deficiencias conductuales específicas, conforman el llamado "cerebro social" (Brothers, 1990). Históricamente comprende áreas relacionadas con la percepción y el procesamiento de las caras (corteza somatosensorial y temporal), las emociones (amígdala) y la función ejecutiva (corteza prefrontal).

Teniendo en cuenta que el presente estudio pretende establecer un marco translacional para el

paciente con EA, partiendo del modelo murino debemos considerar las limitaciones de este modelo. Partiendo de esa base, los estudios de reconocimiento social deben fundamentarse sobre comportamientos no directamente relacionados con el apareamiento o las relaciones entre padres y crías, sino sobre procesos etológicamente relevantes para las demandas de procesamiento social en roedores, incluyendo motivación/afiliación social, memoria/reconocimiento social y dominancia. Estos dominios conductuales pueden, de esta forma, asimilarse conceptualmente con las categorías humanas: i) motivación social, ii) reconocimiento tanto de uno mismo como de sus semejantes iii) establecimiento de las jerarquías intragrupalas.

El reconocimiento social en roedores depende fundamentalmente del hipocampo, dada su importancia en la formación de la memoria (Kogan et al., 2000), y la porción medial del complejo amigdalino (MeA), que se encarga de procesar las señales olfativas volátiles (Noack et al., 2015). Ambas estructuras son evaluadas en los paradigmas conductuales que evalúan la motivación social en roedores. Estos paradigmas basados en pruebas de preferencia social, como el 3-chamber-test, evalúan la preferencia frente a un objeto/individuo y/o individuo familiar/nuevo (Moy et al., 2004) y en ellos la MeA es importante dado que estaría implicada en la recuperación de señales olorosas necesarias para la memoria de reconocimiento (Noack et al., 2010).

1.4.1. El córtex prefrontal

El córtex prefrontal (CPF) es un regulador del reconocimiento social tanto en humanos como en roedores. En los seres humanos, el reconocimiento social acontece durante la infancia y la adolescencia, por lo que la maduración adecuada de los circuitos del CPF puede desempeñar un papel clave en esta trayectoria. En este sentido, el CPF modula la toma de decisiones y el control ejecutivo, de manera que, integrando las claves emocionales y sensitivas, adecua cada decisión al contexto de la situación percibido.

Las áreas cerebrales que regulan el reconocimiento/motivación social no difieren de las que están implicadas en las conductas de recompensa en general, esto es, el estriado ventral, la amígdala y el CPF, incluyendo la corteza frontal orbital medial (mOFC) y la corteza cingulada anterior perigenual (Chevallier et al., 2012). En general, las regiones mediales del CPF, incluyendo las áreas mediales (CPFm), dorsomediales (CPFdm) y ventromediales (CPVm), son esenciales para comportamientos de reconocimiento social como la motivación, la identificación tanto de uno mismo como de los demás y el establecimiento de conductas grupales complejas (Bicks et al., 2015). En este sentido, se ha demostrado que los pacientes con lesiones del CPFvm muestran tanto aislamiento social y apatía (Barrash et al., 2000) como una disminución del comportamiento prosocial, evaluado mediante juegos de toma de decisiones sociales (Krajbich et al., 2009). De igual manera, individuos con altas puntuaciones en la escala de psicopatía presentan una disminución de la actividad del CPFvm al realizar tareas de cooperación (Rilling et al., 2007).

Por su parte, los comportamientos sociales que implican el reconocimiento tanto de uno mismo como de los demás están relacionados sistemáticamente con la activación de un área medial particular del CPF que incluye el CPFm y CPFdm (Amodio & Frith, 2006).

La cognición social emocional/implícita engloba principalmente a las regiones fuera del CPF, como la circunvolución frontal inferior y la amígdala, mientras que CPFm y CPFdm están implicadas en el reconocimiento social explícito (Frith & Frith, 2008; Mitchell, 2009; Shamay-Tsoory et al., 2009).

De igual manera, la parte lateral del CPF está íntimamente relacionada con las percepciones jerárquicas. Se ha demostrado que el CPF lateral se activa al ver a un individuo que se encuentra en un escalón jerárquico superior, ya sea en condiciones estables o inestables, mientras que la amígdala y la porción medial del CPF solo se activan en condiciones jerárquicas inestables (Zink

et al., 2008). De esta manera podríamos decir que la porción lateral del CPF desempeña una función importante en la percepción del lugar que ocupa el individuo en la jerarquía, mientras que tanto la porción medial del CPF como la amígdala modulan la adaptación a una estructura jerárquica cambiante (Bicks et al., 2015).

En roedores, existen ciertas evidencias de que el CPF está implicado en el reconocimiento social. En este sentido se ha demostrado que la lesión en ACC, pero no así en OFC, afecta al reconocimiento social en ratas (Rudebeck et al., 2007). El factor de crecimiento de fibroblastos 17 (Fgf17) es una molécula de señalización segregada que participa en el desarrollo del cerebro anterior rostral (Cholfin & Rubenstein, 2007). De igual manera los ratones deficientes en Fgf17, implicado en el desarrollo del cerebro rostral anterior, muestran tanto un déficit en el reconocimiento social como una disminución en la activación de c-fos en el CPF tras explorar un entorno nuevo (Scearce-Levie et al., 2008). Estas pruebas apuntan a la importancia del CPF en el reconocimiento social (Scearce-Levie et al., 2008) y del CCA específicamente en ratas (Rudebeck et al., 2007). No obstante, hasta la fecha, no se puede concluir que el CPF desempeñe una función relevante en el reconocimiento social en roedores.

1.4.2. La corteza somatosensorial y temporal

La corteza somatosensorial (SSC) se ha implicado en el reconocimiento de las emociones faciales (Adolphs, 2010), y la corteza temporal (TC) en el procesamiento visual de las caras (Tsao, 2006).

1.4.3. La amígdala

La amígdala es una estructura compleja, importante para el procesamiento emocional, situada en el lóbulo temporal. Aunque sus circuitos y funciones se han conservado durante la evolución, se

han observado diferencias entre las especies. Mientras en especies como los reptiles, aves y peces se observa una región similar a la amígdala, en primates esta región engloba a aproximadamente 13 núcleos (Sah et al., 2003).

Ampliamente conectada con estructuras tanto corticales como subcorticales, su gran heterogeneidad se asocia a una gran variedad de funciones entre las que destaca el procesamiento de las emociones.

La amígdala, convencionalmente vinculada al procesamiento de estímulos relacionados con el miedo o la detección de amenazas, desempeña de igual manera una importante función en la cognición y comportamiento social (Adolphs, 2010). En este sentido, también se ha relacionado a las cortezas perirrinal y entorrinal y a la corteza polar temporal, con estos comportamientos sociales. El efecto de la amígdala sobre este tipo de comportamiento depende de los efectos sustanciales del contexto, de los estímulos y es notablemente susceptible a las diferencias individuales.

La amígdala sirve de punto “pívot” o de nexo de tres redes corticolímbicas parcialmente distintas relacionadas con funciones sociales disociables. Por una parte, una red de apoyo a la **percepción**, implicada en los procesos sensoriales implicados en la detección, descodificación e interpretación de las señales sociales relacionadas tanto con la experiencia pasada como con la presente. En segundo lugar, una red que apoya la filiación, importante para los procesos asociados a la motivación de comportamientos prosociales o filiativos, como consolar a un ser querido. Por último, una red relacionada con la aversión, importante para los procesos que permiten las conductas de evitación, como alejarse de un individuo extraño que nos genera desconfianza (Bickart et al., 2014).

1.4.3.1. El complejo amígdala basolateral

Anatómicamente, el núcleo más ampliamente estudiado es el complejo amígdala basolateral (BLA). Este núcleo está compuesto principalmente por neuronas de proyección excitatoria glutamatérgica que reciben proyecciones sensoriales de los núcleos talámicos y de la corteza, y a su vez proyectan a otras áreas cerebrales dentro del circuito social, como el CPFm, el septum lateral, la amígdala central (CeA), corteza auditiva, el hipotálamo, hipocampo ventral (vHPC) y el núcleo accumbens (NAcc) (T.-N. Huang et al., 2019; Janak & Tye, 2015).

La BLA tiene especial relevancia en los procesos afectivos y el aprendizaje social, adaptando la conducta a la variación en los estímulos que el individuo recibe del entorno (Wassum & Izquierdo, 2015). De igual manera, también se ha visto un aumento de su actividad durante la conducta social (Katayama et al., 2009; Rosenberger et al., 2019). Recientemente se ha demostrado, empleando marcadores retrógrados desde mPFC a BLA, que las neuronas que proyectan desde BLA a la corteza infralímbica (IL) se activan preferentemente en respuesta a una señal social en comparación con las neuronas que proyectan desde BLA a la corteza prelímbica (PL), de manera que o bien que la activación de los circuitos PL-BLA o la inhibición de los circuitos IL-BLA altera la conducta social (W.-C. Huang et al., 2020).

Especialmente interesante son las proyecciones desde BLA hasta el vHPC. Se ha demostrado, mediante estudios de optogenética, que la activación bilateral de estas proyecciones reduce la interacción social, tanto en el test de *resident intruder* como en el de sociabilidad en el paradigma de las tres habitaciones, mientras, paradójicamente, aumentan las conductas de autocuidado de estos animales (Gur et al., 2014).

De igual manera tanto en humanos como en roedores, la BLA está implicada en a trastornos o conductas de la ansiedad (Katayama et al., 2009). La BLA proyecta a regiones relacionadas con el miedo y la ansiedad tales como la amígdala central (CeA) y el núcleo de la estría terminal (ST). Estas neuronas tienen una respuesta preferente a estímulos aversivos (Beyeler et al., 2016) mientras que la proyección desde BLA a CeA se refuerza por el miedo condicionado (Namburi et al., 2015). Las neuronas de BLA también envían proyecciones recíprocas retrógradas hacia áreas corticales frontales mediales y laterales para modular los procesos ejecutivos relacionados con estímulos emocionalmente relevantes. En relación con las pruebas de comportamiento, las lesiones bilaterales en BLA y MeA inducen respuestas ansiogénicas en las pruebas de campo abierto y laberinto elevado, sin implicar afectación en la interacción social (Wang et al., 2014).

1.4.3.2. La amígdala medial

Un nodo único dentro de la red de comportamiento social y la sociabilidad es la MeA. La MeA es un núcleo fundamental para una amplia gama de comportamientos sociales, estando implicada tanto en funciones sensoriales como conductuales y conectada funcionalmente con una amplia red de regiones del sistema límbico (Lymer et al., 2018).

La MeA difiere de otras divisiones del complejo amigdalino más comúnmente estudiadas, como la amígdala basolateral, en que presenta propiedades anatómicas, citoarquitectónicas y funcionales únicas (Canteras et al., 1995; Petrulis, 2020). Funcionalmente responde a situaciones de miedo y estrés, Recibe una fuerte entrada aferente vomeronasal del sistema olfativo accesorio, que capta las señales de las feromonas y es la principal región encargada de transmitir las al resto del cerebro (Keshavarzi et al., 2015; Mohedano-Moriano et al., 2007; Pro-Sistiaga et al., 2007). De igual

manera, la MeA también recibe entradas indirectas del sistema olfativo principal a través de la amígdala cortical (Keshavarzi et al., 2015).

A nivel anatómico, podemos diferenciar cuatro subdivisiones principales: dorsal (MeAad), anteroventral (MeAav), posterodorsal (MeApd) y posteroventral (MeApv). Mientras que las subdivisiones dorsales contienen una mayor fracción de neuronas inhibitoras, las ventrales presentan mayor porcentaje de neuronas excitadoras (Keshavarzi et al., 2014).

En cuanto al patrón de proyecciones, se ha evidenciado en roedores, que la mayor parte de estas subregiones se proyectan densamente y reciben proyecciones recíprocas de áreas como la ST, el área preóptica medial (MPOA), la amígdala posterior (PA), el núcleo premamilar ventral (PMv) y el hipotálamo ventromedial (VMH) (Cádiz-Moretti et al., 2016; Canteras et al., 1992, 1995; Gu et al., 2003). Por su parte, la MeAad también proyecta al bulbo olfativo accesorio (AOB) (Canteras et al., 1995). Además de estas proyecciones recíprocas, el MeA también recibe entradas unidireccionales de los núcleos talámicos y de la corteza entorrinal y perirrinal (Cádiz-Moretti et al., 2016; A.J McDonald & Mascagni, 1997).

Aunque la cartografía de proyecciones anatómicas de la MeA humana no está bien establecida, se ha demostrado que muchas de estas proyecciones se conservan en primates no humanos. En este sentido, hacia la MeA de los primates no humano se han observado entradas procedentes de los bulbos olfatorios, los núcleos hipotalámicos, los núcleos amigdalinos, la ST y la corteza entorrinal (Amaral et al., 1982; Alexander J. McDonald, 1998; D. L. Price et al., 1991; Raam & Hong, 2021).

Además, se ha observado una expresión génica sexual diferente en las subpoblaciones GABAérgicas y glutamatérgicas de la MeA (Chen et al., 2019). Así, las neuronas GABAérgicas presentan una expresión génica de mayor dimorfismo sexual que las neuronas glutamatérgicas, lo

que concuerda con las funciones conductuales de dimorfismo sexual de las neuronas GABAérgicas (Chen et al., 2019).

En este sentido, puede presentar una gran relevancia las aferencias que, procedentes del AOB, recibe la MeA. Este AOB se encuentra a dos estaciones sinápticas del órgano vomeronasal (VNO), el cual desempeña una importante función tanto en el procesamiento de las señales feromonales como en la diferenciación de las señales sensoriales sociales (Mohedano-Moriano et al., 2007; Pro-Sistiaga et al., 2007). Sin embargo, no debemos obviar que la MeA desencadena una respuesta más específica para discriminar diferentes señales sociales (machos, hembras, crías, señales de depredadores...), estando sus respuestas, incluso las del AOB, más determinadas a los olores de machos y hembras (Bergan et al., 2014).

Aparte de su papel en el procesamiento de las señales sensoriales, la MeA también está implicada en la agresividad. Se ha visto que la estimulación optogenética de las neuronas GABAérgicas, pero no así de las glutamatérgicas, presentes en la MeApd de ratones macho promueve la agresividad de forma temporizada (Hong et al., 2014). Estos resultados no implican que todas estas neuronas desempeñen un papel unitario en estimular la agresividad, ya que la MeA está formada por subtipos heterogéneos de neuronas GABAérgicas (Chen et al., 2019), existe la posibilidad de que un subconjunto de neuronas GABAérgicas (como ciertas interneuronas locales) pueda desempeñar un papel distinto (o incluso opuesto) en la agresión.

En cuanto a la implicación de la MeA en el comportamiento sexual, mientras que los estudios de lesiones en machos parecen indicar una respuesta global en el apareamiento (Kondo, 1992), en las hembras comportamientos sexuales tales como la lordosis parecen depender más específicamente de la MeApv (DiBenedictis et al., 2012; Ishii et al., 2017). De igual manera, las neuronas presentes

en esta área que responden a las feromonas sexuales en las hembras son muy diferentes de las que se activan frente a los olores de los depredadores.

De igual manera, la inactivación de la MeA parece estar implicada en los comportamientos tanto de crianza como de recuperación de las crías. En este sentido, la estimulación optogenética de las neuronas GABAérgicas en el MeA promueve comportamientos de crianza dirigidos a las crías tanto en ratones macho como hembras, mientras que la estimulación de alta intensidad en los machos induce comportamientos infanticidas (Chen et al., 2019). Este comportamiento infanticida estaría relacionado con la captación de señales feromonales dentro del eje VNO-AOB (Isogai et al., 2018; Trouillet et al., 2019).

Por último, la MeA también es importante para la memoria de reconocimiento social, sobre la que se fundamentan las interacciones sociales de un individuo. Así, se ha demostrado que la infusión local de un antagonista de los receptores de oxitocina en MeA afecta a la memoria social (Ferguson et al., 2001), ya que la memoria social requiere de una depresión a largo plazo dependiente de la oxitocina en las proyecciones sinápticas que van del AOB a MeA (Gur et al., 2014).

Además de las funciones sociales descritas anteriormente, MeA también participa en otros contextos conductuales, como el aprendizaje social (Twining et al., 2017), la dinámica social de grupo (Shemesh et al., 2016), los comportamientos de autoasistencia (Hong et al., 2014) y la interacción entre especies, como el comportamiento defensivo hacia los depredadores y la evitación de éstos (Ishii et al., 2017; Li et al., 2017; S. M. Miller et al., 2019).

Es importante destacar que, aunque la función del MeA ha sido difícil de dilucidar en primates humanos y no humanos, su participación en los procesos sociales en estos contextos parece estar conservada.

En este sentido, los resultados derivados de lesiones de MeA en primates sugieren un papel clave de esta área en el funcionamiento social. Aunque ningún estudio ha lesionado específicamente la MeA, lesiones amplias que incluyen MeA junto con otros núcleos amigdalares inducen una disminución del miedo y la agresividad (Emery et al., 2001; Meunier et al., 1999). En el humano es importante para la afiliación social y el vínculo materno (Atzil et al., 2017; Bickart et al., 2012). Además, la MeA se suele agrupar como parte de la CMA (amígdala centromedial, que incluye el núcleo central de la amígdala), la cual se activa en los circuitos implicados en la empatía y la recompensa social (Bzdok et al., 2012; Rademacher et al., 2010). Pacientes con grandes lesiones de la amígdala, que incluyen la MeA, presentan déficits en el reconocimiento de las emociones, mientras que aquellos con lesiones que no afectan a esta área mantienen intacta su capacidad de reconocimiento social (Adolphs et al., 2002; Becker et al., 2012).

1.5. MODELOS ANIMALES PARA EL ESTUDIO DE LA EA

El estudio de la EA desde sus inicios hasta la fecha ha progresado, basándose en modelos experimentales que nos permiten no solo conocer mejor la enfermedad a nivel biológico y conductual sino también comprender mejor su patogénesis y realizar pruebas preclínicas de nuevas terapias.

Hasta la fecha, la gran mayoría de los modelos experimentales son modelos animales, que consisten casi exclusivamente en ratones transgénicos. Estos ratones expresan genes humanos que dan lugar a la formación de placas amiloides (mediante la expresión de APP humana sola o en

combinación con PSEN1 humana) y ovillos neurofibrilares (mediante la expresión de MAPT humana (Drummond & Wisniewski, 2017).

1.5.1. Modelos monogénicos y bigénicos

Los modelos transgénicos iniciales que surgieron se realizaron con una mutación individual para la EA familiar. El primer modelo de ellos fue de ratón PDAPP, que expresaba APP humana con la mutación indiana de APPV717F con el PDGF (Games et al., 1995).

Más adelante surgió el modelo de ratón Tg2576 estos expresaron APP humana con doble mutación Swedish (APPK670N, M671L), con el control del promotor PrP (proteína priónica de hámster) (Sturchler-Pierrat et al., 1997). Más adelante se observó que la expresión de múltiples mutaciones relacionadas con la EA familiar daba como resultado una patología tipo Alzheimer más grave, como en ratón J20 (Younkin, 1995).

Asimismo, se han desarrollado modelos transgénicos para PSEN1 , estos animales presentan AB42, pero no presentan pérdida neuronal ni placas amiloides (Elder et al., 2010). También existe el modelo de ratón que expresan tau, los más utilizados son los que expresan tau 4R con mutaciones de P301L o P301S (Yoshiyama et al., 2007).

1.5.2. Modelos trigénicos. El modelo 3xTgAD

A principios de este siglo, se logró crear un modelo triple transgénico (3xTg-AD), que expresaba tres genes relacionados con la EA familiar, APPwe, PS1M146V y tau P301 (Oddo, Caccamo, Shepherd, et al., 2003). Este modelo representa un claro inicio de la enfermedad, pues

dependiendo de la edad se desarrolla la neuropatía en estos ratones (Mastrangelo & Bowers, 2008; Sterniczuk, Dyck, et al., 2010). El ratón 3xTgAD representa depósitos amiloides intracelulares en el neocórtex a los 3 meses (Billings et al., 2005) (Janelsins et al., 2005) a los 6 meses se observan amiloides extracelulares de beta amiloide en la corteza frontal (Oddo, Caccamo, Shepherd, et al., 2003) y en el hipocampo (Billings et al., 2005) (Janelsins et al., 2005) y a los 12 meses se desarrolla en el hipocampo y regiones corticales, sin embargo los ovillos de tau se observan a los 12 meses en las neuronas piramidales CA1 del hipocampo (Oddo, Caccamo, Kitazawa, et al., 2003). En estos ratones antes de que se formen la $A\beta$ se ha visto un comportamiento de deambulación aumentado y un nivel exploratorio reducido en comparación con los controles (Giménez-Llort et al., 2007).

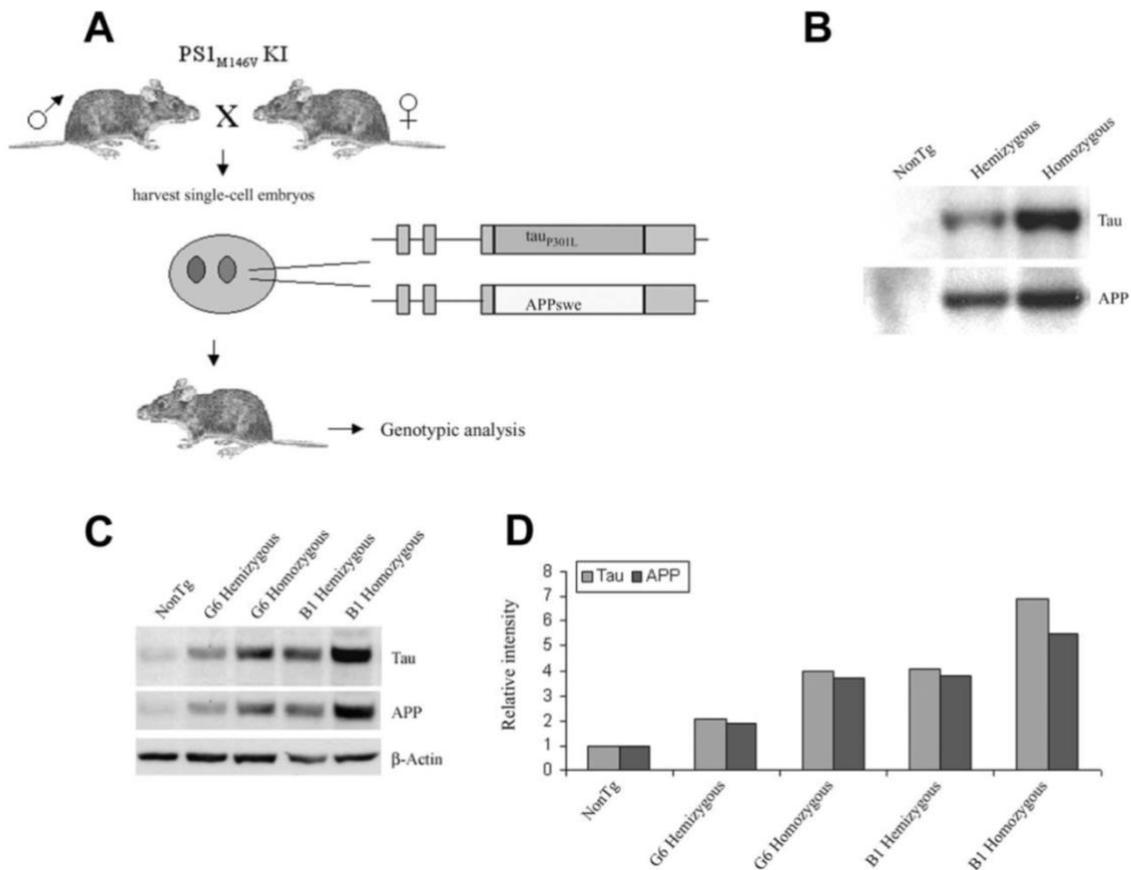


Figura 4. Representación gráfica de la creación del ratón 3xtg-AD. La figura muestra la inyección de dos constructos codificando APP^{sw} and tau_{P301L} (A) el análisis genotípico para la identificación de los ratones homocigóticos (B), la expresión de Tau y APP expression está doblada en el ratón homocigótico (C) y los niveles estables de la proteína APP y tau son aproximadamente de 3 a 4 veces y de 6 a 8 veces más altos que los niveles endógenos en los hemicigotos. Tomado de (Oddo, Caccamo, Shepherd, et al., 2003).

1.6. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS

Con el incremento de la esperanza de vida y la ausencia de tener una terapia estratégica contra la EA, esta se convierte en un problema social sanitario, afectando no solo a la persona que la padece, sino también al cuidador a nivel económico y emocional.

En la actualidad se estima que la EA puede contribuir del 60 al 70% de los casos a nivel internacional (OMS, 2020). En el caso de la población española, estos datos no difieren mucho de los observados a nivel europeo (Virués-Ortega et al., 2011), donde se estima una prevalencia del 5,05%, duplicando por sexo las mujeres a los hombres, y una incidencia del 11,08 por 1.000 personas-año siendo ambos factores crecientes por grupos de edad (Niu et al., 2017).

Las alteraciones en la memoria y el reconocimiento social, han sido omitidas como dianas de los estudios sobre la patología asociada a la EA, y cuando ha sido abordadas, como es el caso de la EA moderada, ha mostrado resultados inconsistentes (Bucks & Radford, 2004; Kohler et al., 2005). Por lo tanto, la disfunción social asociada a los estados de demencia leve-moderada de la EA es poco conocida. En particular, sigue sin estar claro hasta qué punto los procesos neurodegenerativos que conducen a la demencia de tipo Alzheimer alteran la capacidad de procesar señales sociales básicas. La detección clínica del paso del deterioro cognitivo leve a la demencia moderada tipo Alzheimer resulta bastante difícil. Una opción es intentar diagnosticar las alteraciones en la autonomía del paciente, ya sea a nivel profesional, de la vida cotidiana o de sus relaciones sociales.

De igual manera, hasta la fecha no se ha realizado un estudio neuroanatómico profundo sobre las estructuras relacionadas con la memoria social. Para ello, los modelos animales de la enfermedad, como el modelo 3xTgAD resultan sumamente útiles.

1.7. OBJETIVOS

Partiendo de lo antes mencionado, nuestro trabajo se centra en los siguientes objetivos:

Objetivo 1: Determinar si existen alteraciones en la conducta relacionada con la memoria y reconocimiento social asociados con el desarrollo de los depósitos neuropatológicos en el modelo 3xTgAD.

Con el fin de evaluar la relación de los cambios en el comportamiento en relación con la patología de la EA, se utilizarán varias pruebas de comportamiento de manera que este objetivo general lo podemos subdividir en tres objetivos secundarios.

Objetivo 1.1. Analizar si los animales del modelo 3xTgAD presentan rasgos ansiogénicos subyacentes a la patología tipo Alzheimer asociados con la progresión de la enfermedad.

Objetivo 1.2. Determinar las posibles alteraciones en la memoria de trabajo relacionadas con los distintos estadios de la patología tipo Alzheimer.

Objetivo 1.3. Estudiar las posibles deficiencias en las tareas de reconocimiento social en el modelo 3xTgAD y definir su inicio o progresión relacionada con los patrones temporales de formación de los depósitos neuropatológicos.

Objetivo 2: Determinar la funcionalidad de la amígdala en diferentes estados temporales relacionados con la aparición de depósitos patológicos en animales 3xtg-AD.

Para ello analizaremos la actividad neuronal mediante marcaje de c-Fos en la amígdala de los ratones 3xtg-AD. c-fos es un gen temprano inmediato que se induce rápida y transitoriamente en

las neuronas después de aplicar una variedad de estímulos. La expresión del gen inmediato temprano c-fos y su producto proteico c-Fos en núcleos celulares se ha utilizado ampliamente para mapear la actividad funcional evocada por estímulos en el cerebro y como indicador de la activación neuronal (García-Díaz et al., 2019).

2. MATERIALES Y MÉTODO

2.1. ANIMALES

Los experimentos se realizaron en ratones hembra 3xTg-AD (B6129-psen1tm 1Mpm Tg (APP^{swe}, tau P301L) 1L alfa /Mmjax (Jackson Laboratory: MMRRC Stock No: 34830 JAK)) que presentaban tres genes mutantes humanos: PS1M146V, APPSWE y tau (TauP301L) y en animales de hembra tipo salvaje (WT) salvaje (B6129F/J (Jackson Laboratory: MMRRC Stock No: 101045) emparejados por edad. Las ratonas WT utilizados en este estudio tienen el mismo fondo o *background* genético de los embriones knock-in de presenilina utilizados para generar el modelo de ratón 3xTg-AD, pero en lugar de expresar el gen mutante PS1M146V expresan el gen endógeno PS1M146V del ratón WT (Oddo, Caccamo, Shepherd, et al., 2003). Las ratonas fueron destetadas a los 21 días de edad y alojadas en grupos de 2-4 compañeras de camada en jaulas de plástico (18,75 cm x 28 cm x 12,5 cm). Los animales se mantuvieron a 22 ± 2 °C, 60% de humedad relativa, en un ciclo de luz y oscuridad de 12 h, con acceso a agua y comida *ad libitum*. Las camadas 3xTgAD y de tipo salvaje se criaron en las instalaciones de cuidado de animales del Servicio de Experimentación Animal (SEA) de la Universitat Jaume I. La experimentación animal se llevó a cabo de acuerdo con las directrices establecidas por la legislación española (RD 53/2013) y el reglamento de la Unión Europea (2010/63/UE) y también con las directrices de la directiva de la Comunidad Europea para el uso de animales en el laboratorio (2010/63/UE). Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité de Ética de la Universitat Jaume I (número de aprobación 2015 / VSC / PEA/00213).

Durante todo el proceso experimental se ha seguido estrictamente la regla de las 3Rs de la European Research Association, reduciendo el número de animales y refinando los procedimientos empleados para preservar el bienestar de los animales. Es por ello por lo que empleamos 60

animales hembra 3xTgAD y 60 animales hembra WT. Los animales fueron aleatoriamente divididos en 5 grupos relacionados con cinco (5) marcos temporales, a saber 3, 6,9, 12 y 15 meses de edad.

2.2. PRUEBAS DE COMPORTAMIENTO

Todas las pruebas de comportamiento se realizaron en días sucesivos, por lo que, para evitar el estrés en los animales que pudiesen interferir en los procesos de aprendizaje y retención, se distribuyeron comenzando por las pruebas con menor demanda cognitiva y finalizando con las de mayor demanda.

Todos los experimentos conductuales se llevaron a cabo entre las 9.00 y las 13.00 horas, siempre en la misma sala. Dicha sala experimental es a prueba de sonido y presenta una corriente de aire regulada, en la que los animales permanecieron 30 minutos antes de cada prueba, evitándose cualquier estrés ambiental o físico por contexto que pudiese alterar el resultado de las pruebas. Todos los aparatos utilizados se limpiaron minuciosamente antes y después de cada sesión de ensayo con una solución al 30% de etanol.

2.2.1. PRUEBAS DE ANSIEDAD

Para evaluar la ansiedad en los animales, procedimos a realizar dos pruebas conductuales, las cuales fueron la prueba de campo abierto y la prueba de laberinto elevado.

2.2.1.1. Laberinto elevado (elevated plus maze)

La prueba del laberinto elevado (PM) se ha utilizado como protocolo para el estudio de la ansiedad en roedores durante décadas , teniendo una alta validez (Rodgers & Dalvi, 1997). Esta prueba, al

igual que la anterior, aprovecha la aversión natural de los roedores a los campos expuestos. Por lo tanto, se basa en un agente ansiogénico, un campo elevado sin protección [25], expresándose el nivel de ansiedad como el número de entradas y el tiempo que el animal pasa en la zona aversiva. Junto con el OF, constituye una de las pruebas de elección para evaluar las bases genéticas del comportamiento ansioso en el roedor, incluidos los modelos animales modificados genéticamente, como los ratones transgénicos de nuestro estudio. De igual manera, también nos da información de las medidas de locomoción y exploración del animal.

La PM consistía en dos brazos abiertos (30×5 cm, rodeados por un borde de 0,25 cm de altura) y dos brazos cerrados (45×5 cm, rodeados por paredes de 40 cm de altura), con los dos pares de brazos idénticos, que salían de una plataforma central (5×5 cm), colocados uno frente al otro [19]. La base de los brazos y la plataforma central eran de plexiglás negro, mientras que las paredes de los brazos cerrados eran de plexiglás translúcido. El aparato estaba elevado 45 cm por encima del suelo (Podhorna & Brown, 2002).

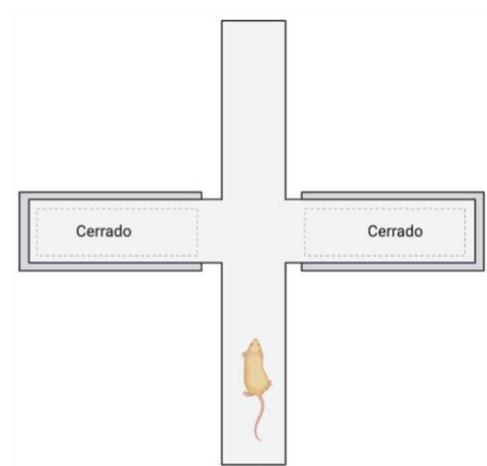
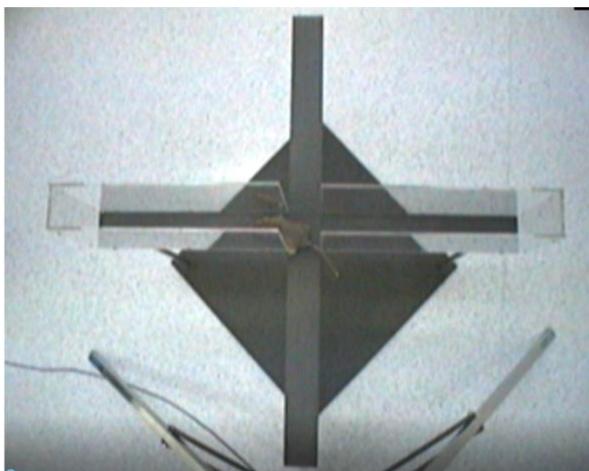


Figura 5. Prueba de laberinto elevado. La prueba esta constituida por dos brazos abiertos y dos cerrados. Al momento de la prueba el animal se coloca en el centro y se permite que explore libremente durante 5 minutos.

Para llevar a cabo nuestro experimento adaptamos dos protocolos previamente validados (Podhorna & Brown, 2002; Psotta et al., 2015).

Tras el período de habituación del animal a la sala, se procedió a realizar la prueba de laberinto elevado durante 5 minutos. La prueba se inició colocando al ratón en la plataforma central del laberinto, de manera aleatoria de cara a uno de los brazos abiertos (Podhorna & Brown, 2002; Psotta et al., 2015), y dejándolo moverse libremente. El comportamiento fue registrado con una cámara de vídeo (Sony, Canadá) colocada sobre el aparato. Las grabaciones de las sesiones de prueba se evaluaron con el software Smart 2.5. 19. El laberinto se limpió cuidadosamente con alcohol al 30%. Se consideró permanencia o entrada en un brazo/centro cuando el animal introducía su cabeza y cuatro patas dentro del área determinada, Los parámetros analizados fueron los siguientes:

- Número de entradas y tiempo en el brazo cerrado: número de veces que el animal permanecía o entraba en el brazo cerrado y tiempo que permanecía en el mismo.
- Número de entradas y tiempo en el brazo abierto: número de veces que el animal permanecía o entraba en el brazo abierto y tiempo que permanecía en el mismo.
- Número de entradas y tiempo en el centro del PM: número de veces que el animal permanecía o entraba en el centro del laberinto y tiempo que permanecía en el mismo.

2.2.1.2. Prueba de campo abierto

El laberinto de campo abierto (OF) se desarrolló inicialmente en 1934 como una prueba para medir la emocionalidad en roedores (Hall, 1934). Desde entonces ha alcanzado el estatus de ser una de las pruebas de comportamiento más utilizadas en los estudios conductuales en animales (R. N.

Walsh & Cummins, 1976). Esta prueba proporciona una evaluación fácil y bastante rápida de comportamientos bien definidos, y no requiere ningún entrenamiento previo del animal y poco o ningún entrenamiento especializado para el personal investigador que la administra. Parte de su popularidad y amplio uso se debe a que los conceptos psicológicos y fisiológicos en los que se basan son, en general, sencillos y de fácil comprensión. En este sentido, se ha postulado que la presión evolutiva ha seleccionado una respuesta común en los animales, de modo que la mayoría de las especies muestran respuestas de miedo o huida mediadas por la ansiedad ante estímulos específicos. Los roedores, por ejemplo, muestran una clara aversión a los entornos amplios, iluminados, abiertos y desconocidos, que podrían resultarles en una mayor exposición a los depredadores en espacios no controlados (Choleris, 2001). Podemos, así, suponer que han sido condicionados filogenéticamente para ver este tipo de entornos como peligrosos. Todas estas características pueden ser analizadas en el OFM y constituyen la base de su uso en las pruebas de paradigma conductual (Carola et al., 2002). En general, consiste en espacio cerrado, de forma cuadrada u ovalada, con la suficiente altura imposibilitar que el animal se escape (Seibenhener & Wooten, 2015). Parámetros como una menor locomoción o una mayor preferencia del animal por situarse cerca de las paredes de la caja se relacionan con una conducta mayor ansiogénica (Carola et al., 2002). Para nuestra investigación hemos utilizado un protocolo adaptado de investigaciones previas (Brown et al., 1999; Podhorna & Brown, 2002).

Brevemente, nuestro OF consistía en una superficie realizada con madera y barnizada para una limpieza más eficaz. Dicha superficie, cuadrada y blanca (72×72 cm), estaba dividida en 16 cuadrados (18×18 cm), rodeados por paredes continuas de 25 cm de altura. En el centro del OF se dibujó un cuadrado con líneas rojas. En esta prueba, los 12 cuadrados adyacentes a la pared representan un campo protegido, denominado "periferia del OF", mientras que 4 interiores

representan un campo expuesto o "zona media del OF", finalmente el cuadro central marcado en rojo es el "centro del OF" Adaptado de (Swiergiel & Dunn, 2008).

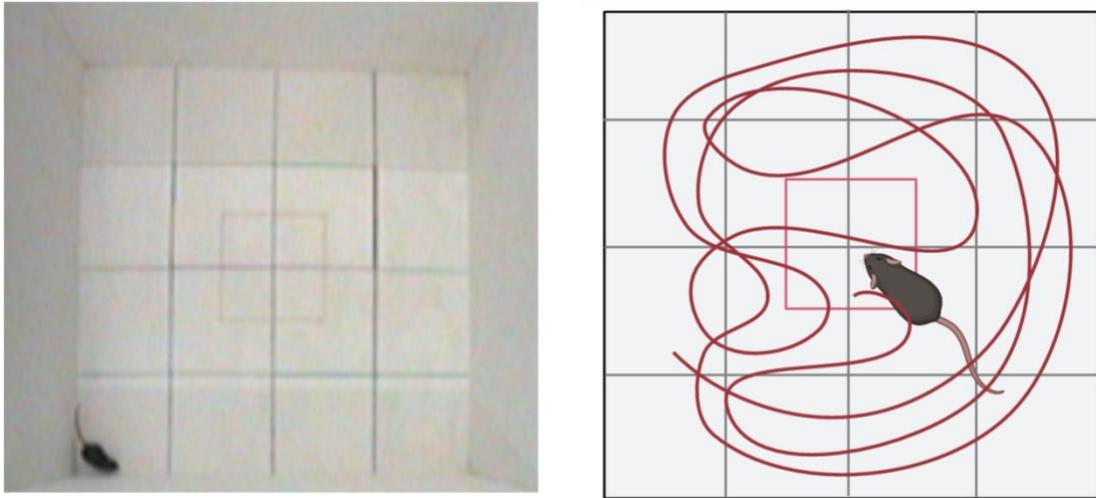


Figura 6. Prueba de campo abierto. Esta constituido por un área cerrada en la cual al momento de realizar la prueba se le permitió al animal moverse libremente la zona del centro (círculo rojo), y en la zona media y en la periferia.

Tras el período de habituación anteriormente referido, la prueba se inició colocando una ratona en el centro del OF y permitiendo la libre exploración durante 5 minutos. El comportamiento de cada uno de los animales fue continuamente registrado mediante una cámara (Sony, Canadá) colocada sobre la estructura y analizado mediante el programa SMART 2.5.19. Los parámetros analizados fueron los siguientes:

- Tiempo en cuadro central: tiempo que el animal pasa en el centro del cuadro marcado en rojo.
- Tiempo en el medio: Tiempo el animal permanece en la zona media del OF.
- Tiempo en la periferia: Tiempo que pasa el animal cerca de las paredes del OF.

Tras finalizar cada prueba el animal fue llevado a su jaula de origen en la sala del animalario que le correspondía.

2.2.2. PRUEBAS COGNITIVAS

Los investigadores del comportamiento animal han tratado de estudiar y medir los aspectos cognitivos en los roedores, un protocolo muy usado para medir la memoria de reconocimiento desde sus inicios es la prueba de reconocimiento de nuevos objetos (Ennaceur & Delacour, 1988), (Cohen & Stackman, 2015). Otra prueba muy usada es la prueba de las tres habitaciones (3-chamber room), la cual nos permite evaluar la memoria de reconocimiento social (Kaidanovich-Beilin et al., 2010), (Felix-Ortiz & Tye, 2014). Ambas pruebas son la que usamos en este estudio.

2.2.2.1. Prueba de reconocimiento de objetos novedosos (NORT)

Permite evaluar tanto la memoria reciente como consolidada. Inicialmente se les presenta a los animales dos objetos y posteriormente uno de los objetos se le cambia por un objeto completamente diferente y por tanto novedoso. Cuando se les presenta un objeto novedoso los animales necesitan examinarlo de cerca. Por otro lado, si algo familiar está presente, requerirá atención y reevaluación. Sin embargo, cuando estímulos nuevos y familiares están presentes juntos, el nuevo estímulo será el más explorado hasta que pierda su novedad. La tarea de reconocimiento de objetos novedosos (NOR) fue realizada en el OF anteriormente descrito (Podhorna & Brown, 2002). El protocolo empleado se adaptó a partir de bibliografía previa (Podhorna & Brown, 2002; Psotta et al., 2015; Stover et al., 2015) y se representa en la figura X. Brevemente, las ratonas fueron sometidas durante dos días consecutivos a 10 minutos de habituación sin objetos en el campo abierto, y 24 horas después a una fase de prueba que consistirá en dos ensayos. En el primer ensayo se colocaron

dos objetos diferentes en esquinas diagonalmente opuestas del campo abierto y se permitió a las ratonas explorarlas durante 10 minutos. Treinta minutos después, uno de los objetos fue reemplazado por un objeto nuevo y la ratona exploró nuevamente durante 10 minutos. Es importante reseñar se que se realizó un contrabalanceo de los objetos antes de entrar el animal en la caja. Mediante una cámara (Sony, Canadá) montada sobre el OF se registraron los movimientos de cada animal durante cada una de las fases del ensayo y los parámetros realizados de la prueba fueron analizados mediante el programa Smart 2.5. 19. Los objetos utilizados fueron pequeños juguetes de plástico de tamaños similares y fácil limpieza. Entre cada ensayo el laberinto se limpió utilizando etanol al 30% para eliminar cualquier señal olfativa.

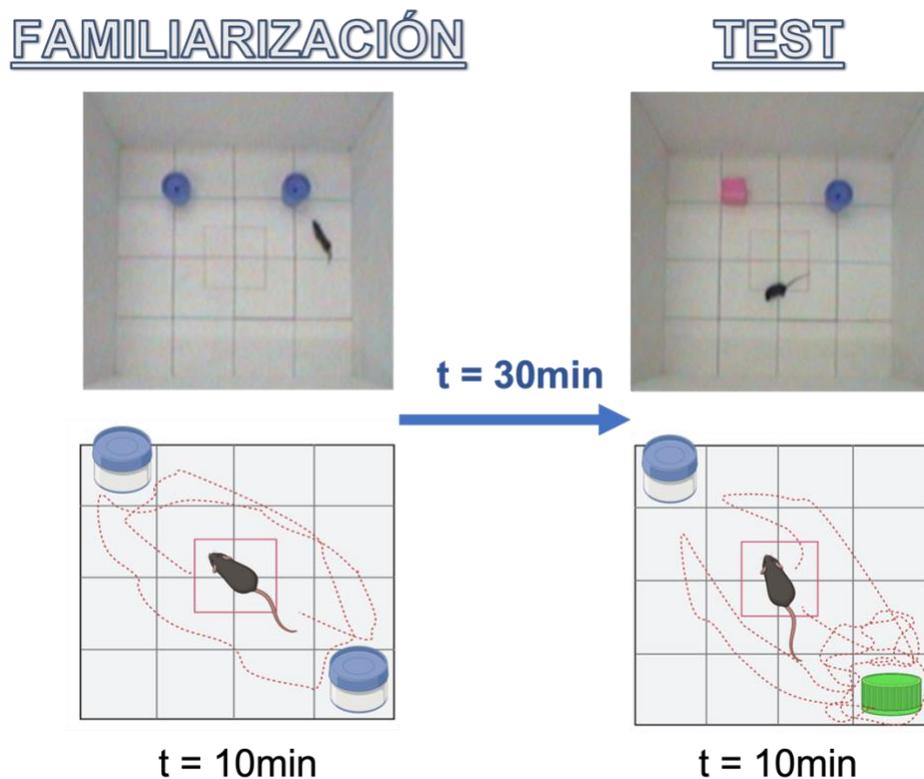


Figura 7. Prueba de reconocimiento de objetos novedosos (NOR). Podemos observar la disposición de los objetos en la fase de familiarización y en la fase de test (o prueba). Durante 10 minutos se permitió al animal explorar libremente dos objetos iguales (fase de familiarización) o dos diferentes, repitiéndose un objeto de la fase previa (fase

de prueba o test). Cada una de las fases tuvo una duración de 10 minutos con un intervalo de 30 minutos entre ambas.

(Creado con Biorender.com)

Los parámetros analizados fueron los siguientes:

- Fase de familiarización: tiempo que el animal pasaba con cada uno de los objetos presentados. Como ambos objetos se prevé que le presenten el mismo grado de novedad para el animal cualquier animal que presentaba diferencias significativas en la preferencia por algún objeto fue descartado en el análisis de los resultados del segundo test.
- Fase de test: tiempo que el animal pasaba con cada uno de los objetos presentados (uno novedoso y el otro familiar).

Para homogeneizar los resultados de la fase test se llevó a cabo una puntuación en base al índice de discriminación calculado en base a la siguiente fórmula

$$\left(\frac{\text{tiempo explorando el nuevo objeto}}{\text{tiempo explorando nuevo objeto} + \text{tiempo explorando objeto familiar}} \right) \times 100$$

2.2.2.2. Prueba de las tres habitaciones (3-chamber-room)

Las pruebas de habituación/deshabituación social, como la 3-chamber-room permite medir dos componentes del comportamiento social de los roedores: 1) el interés en un estímulo social familiar mostrado repetidamente durante un corto período de tiempo; y 2) la capacidad de reconocer un nuevo estímulo social (Tejada y Rissman, 2012; Ujjainwala et al., 2018). En este paradigma, el ratón utilizado para proporcionar un estímulo social se coloca debajo de una taza de alambre para confinarlo en un lugar fijo y separarlo físicamente del ratón cuyo comportamiento se está examinando ("ratón de prueba"). El interés se mide por la cantidad de tiempo que el ratón de prueba

pasa explorando el ratón de estímulo bajo la taza de alambre, normalmente cuantificado mediante el olfateo. Este paradigma puede utilizarse para investigar las influencias biológicas y ambientales sobre el interés social y/o el reconocimiento social.

El test está construido con plexiglás transparente, presenta unas medidas totales de 59x39,5x21,5 cm y está dividido en tres habitaciones de 18,5 cm x 39,5 cm. Las tres habitaciones se comunican mediante una abertura cuadrada de 7x7 cm. Cada una de las habitaciones laterales contiene un cilindro de 20x10 cm de diámetro con barreras de metal, colocadas a 6mm de distancia de cada esquina en cuya parte superior se dispone un contrapeso para evitar su desplazamiento (Ter Horst et al., 2014) .

Como animales señuelo empleamos ratones hembra Swiss que fueron dispuestos en una jaula en una habitación separada para evitar el contacto visual, auditivo y olfativo con los ratones de prueba. Estudios previos han indicado que la cepa del señuelo no cambia el acercamiento social del animal testado (Nadler et al., 2004). Cada animal señuelo se utilizó dos veces al día. Los señuelos para la prueba de sociabilidad y para la prueba de preferencia por la novedad social se tomaron de diferentes jaulas. El confinar al ratón extraño en un cilindro evita las interacciones agresivas y sexuales, asegurando también que todo acercamiento social sea iniciado por el ratón de prueba.

El protocolo empleado, adaptado de (Ter Horst et al., 2014), constó de tres etapas que fueron las siguientes:

1. Habitación: La ratona a testar se coloca en la cámara central, con acceso libre a los tres compartimentos y se le permite explorar durante 5 minutos las tres cámaras. Las dos cámaras laterales contienen un cilindro vacío. El cilindro vacío presenta un nuevo objeto inanimado sin

valor social. Se mide la actividad general, la posible preferencia por una parte del aparato (la cámara central o una de las laterales) y la exploración del cilindro.

2. Sociabilidad: Tras el periodo de habituación, se introduce un ratón desconocido (señuelo) en uno de los cilindros y se coloca en una de las cámaras laterales. La ubicación del animal señuelo se alterna, ya sea a la izquierda o a la derecha de la cámara de prueba social. El cilindro de la otra cámara está vacío. El aumento del tiempo de permanencia en la cámara y en el perímetro alrededor del cilindro con el animal señuelo desconocido indica la preferencia por el estímulo social en comparación con la jaula vacía.

3. Discriminación social (5 minutos): Una vez más, el ratón de prueba es conducido a la cámara central. Se coloca otro ratón desconocido (nuevo señuelo) en el cilindro que estaba vacío durante la prueba de sociabilidad. La ratona señuelo “conocida” permanece en su posición en el cilindro y en la cámara. Se espera que la ratona de prueba pase más tiempo con la nueva desconocida que con la antigua. El aumento del tiempo dedicado a la nueva desconocida es una medida de la capacidad de discriminación de la ratona testada, que también indica una memoria de trabajo intacta.

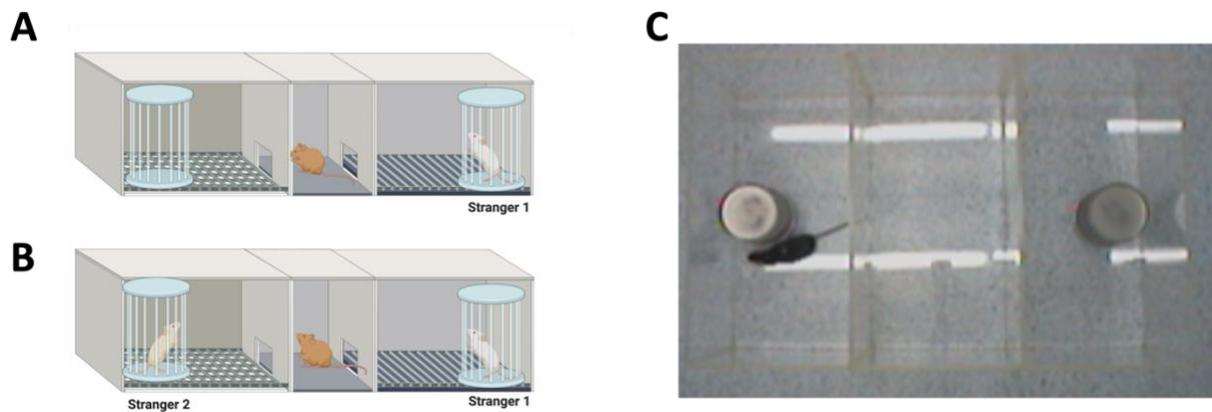


Figura 8. Test de reconocimiento social. Examinaremos los efectos en el reconocimiento social de las ratonas transgénicas frente a (A) una pareja familiar y luego frente a (B) una pareja totalmente novedosa C) Vista superior de la prueba 3-chamber room donde se pueden apreciar las tres habitaciones y los cilindros de metal en el cual se colocaba el animal desconocido o el objeto.

Los parámetros medidos de la prueba se midieron con la ayuda del programa informático Smart 2.5. 19 y una computadora. Tras finalizar la prueba los animales fueron devueltos a su jaula de origen.

2.3. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

2.3.1. Sacrificio y perfusión de los animales

Tras realizar todas las pruebas de comportamiento, no más de una hora después, se procedió al sacrificio de los animales.

Para ello fueron anestesiados usando una sobredosis intramuscular de solución de Dolethal® (Dolethal®, Vetequinol; 60 mg/Kg), y perfundidos. Los animales fueron perfundidos rápidamente transcárdialmente en primer lugar con una solución de NaCl 0.9% para eliminar toda la sangre y, tras 8 minutos, con una solución enfriada con hielo de paraformaldehído (PFA) al 4% durante 10

minutos. Para llevar a cabo las perfusiones se utilizó una bomba de perfusión a 40 rppm. Tras la fijación los cerebros fueron extraídos y postfijados en PFA al 4% durante 4 h a 4°C y posteriormente transferidos a una solución de PB al 0.01 M y pH 7.4 con azida sódica al 0.02% y almacenados a 4° C hasta su uso para inmunohistoquímica (IHC).

2.3.2. Estudio inmunohistoquímico

Los cerebros se seccionaron en seis series constituidas por secciones coronales regularmente espaciadas de 30 µm obtenidas mediante un vibratomo (Leica VT1200S, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemania). Todas las secciones fueron almacenadas en solución crioprotectora (30% glicerol, 30% etilenglicol 30% y PB al 0,01M) a -20°C hasta su procesamiento.

Para evaluar el nivel de proteína neuronal de fos por inmunohistoquímica procedimos a lavar las secciones de cerebro de los animales 5x5 minutos en PBS al 0.01M ,para luego ser sumergidos en un medio de bloqueo de 4% de suero de cabra (NDS, Jackson Immunoresearch, West Grove,PA, E.E.U.U), albúmina de suero bovino (BSA) al 2% (Sigma-Aldridch) en PBS al 0.1 M (pH 7.4) y con 0.1% de Triton X-100 (Sigma-Aldrich) (PBST) durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente las secciones se incubaron durante la noche a 4°C con la solución del anticuerpo primario 1:1000 anti-fos obtenido de conejo (Synaptic Systems, Gottingen, Alemania) en solución de bloqueo. Al día siguiente se procedió a lavar las cortes 5x5 minutos en PBS y se incubaron en una solución 1:200 de anticuerpo secundario biotinilado anti-conejo obtenido de cabra (Jackson Immunoresearch) en PBST durante 2 horas. Después, las secciones de cerebros fueron lavadas con PBS al 0.1M por 3x10 minutos para luego poner el ABC 1:50 (Vectastain-Elite; vector Laboratories, Burlingame, CA, EE.UU). En PBST, después de 3 lavados de 10m minutos en TBS al 0.01 M y 2 lavados de 10 minutos en Tris Buffer al 0.05 M, con pH 8 de TB, la actividad

peroxidasa se reveló con una reacción de tetrahidrocloruro de 3,3 diaminobencidina (DAB) con níquel (0.025%) DAB (Sigma-Aldrich), 0.08% Ni (NH₄) y 0.003% H₂O₂ disueltos en TB al 0.05 M y pH 8 durante 15 minutos. Luego la reacción fue detenida por lavados en TB seguido de 2x10 minutos en PBS al 0.1 M y 1x10 minutos en PB 0.1M. Posteriormente las secciones fueron montadas en portaobjetos y dejadas secar al aire libre durante la noche. Al día siguiente las secciones se deshidrataron en soluciones crecientes de etanol y cubiertas con cubreobjetos en DPX (Sigma-Aldrich) a partir de un lavado en xileno.

2.4. ADQUISICIÓN DE IMÁGENES

Para la toma de las imágenes se utilizó el microscopio Leica (DM750) (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemania), equipado con una cámara Leica (DFC450C) conectada a un PC con el software de adquisición Cámara Leica (Leica Application Suite X). Usamos el atlas de ratón de Paxinos y Franklin (Paxinos & Franklin, 2012), para delimitar los límites de los núcleos analizados. Para la cuantificación de células positivas para c-fos usamos el objetivo 10x para adquirir las imágenes.

Posteriormente las imágenes fueron procesadas empleando el software Image J, escogiendo un fondo de imagen de 50 píxeles tras lo cual la imagen se binarizó automáticamente. Se consideró un marcaje positivo las áreas de >5 micras (15 píxeles). Los datos se expresaron en porcentaje de células marcadas con c-fos frente al área total analizada.

2.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los análisis fueron realizados por un observador cegado a las condiciones experimentales de las muestras. En primer lugar, se analizó la normalidad de las muestras aplicando la prueba de

Kolmogórov-Smirnov y la prueba de Levene para comprobar la homogeneidad de varianzas. En las comparaciones en un solo marco temporal entre las ratonas control y mutantes se aplicará una prueba t de comparación de medias (o la correspondiente prueba Mann Whitney para comparar medianas si la población no siguiese una distribución normal). En el caso de comparaciones entre los distintos marcos temporales (3 meses, 6 meses y 20 meses de edad) si los datos se ajustaban a la normalidad se aplicó una prueba ANOVA de una vía y en caso de detectar diferencias significativas se aplicaría el post-hoc test de Bonferroni. En caso de que los datos no se adaptaran a la normalidad, pero si verificaran la homogeneidad de varianzas se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis para comparación de medianas. Se consideró como hipótesis nula que las ratonas mutantes no tienen consecuencias referidas a los parámetros observados respecto al control con un nivel de significación fijado en $\alpha=0.05$.

3.RESULTADOS

3.1. OBJETIVO 1. DETERMINAR EL PATRÓN TEMPORAL DE LAS ALTERACIONES PATOLÓGICAS Y CONDUCTUALES EN RATONAS 3xTgAD.

3.1.1. Objetivo 1.1. Determinación del nivel de ansiedad en diferentes marcos temporales en el modelo 3xTgAD.

En los seres humanos, los pacientes con EA presentan una falta de contención, denominada desinhibición. Para determinar si existía dicha desinhibición en nuestro modelo 3xTgAD llevamos a cabo dos pruebas, por una parte i) el laberinto elevado (figura 8) y por otra ii) la prueba de campo abierto (ver Tabla 1 y figura 9).

Tabla 1. Datos del análisis estadístico de la prueba del laberinto elevado. En la tabla se representa la significancia estadística, la prueba paramétrica/no paramétrica empleada y los identificadores estadísticos de dicha prueba.

% TIEMPO BRAZOS ABIERTOS				
	P	Test	T, df	Mann Whitney U
3 meses	<0.0001	T test (Welch corrección)	t=6.564, df=9.360	
6 meses	0.47	Mann Whitney	t=2.249, df=20	24
9 meses	0.99	T test	t=0.003801, df=20	
12 meses	0.59	T test	t=0.5508, df=18	
15 meses	0.52	T test	t=0.6553, df=16	
% NÚMERO ENTRADAS EN BRAZOS ABIERTOS				
	P	Test	T, df	Mann Whitney U
3 meses	0.03 (*)	T test (Welch corrección)	t=2.428, df=15.90	
6 meses	0.10	T test	t=1.712, df=18	
9 meses	0.13	T test	t=1.639, df=20	
12 meses	0.17	Mann Whitney		28
15 meses	0.84	T test	t=0.2048, df=18	

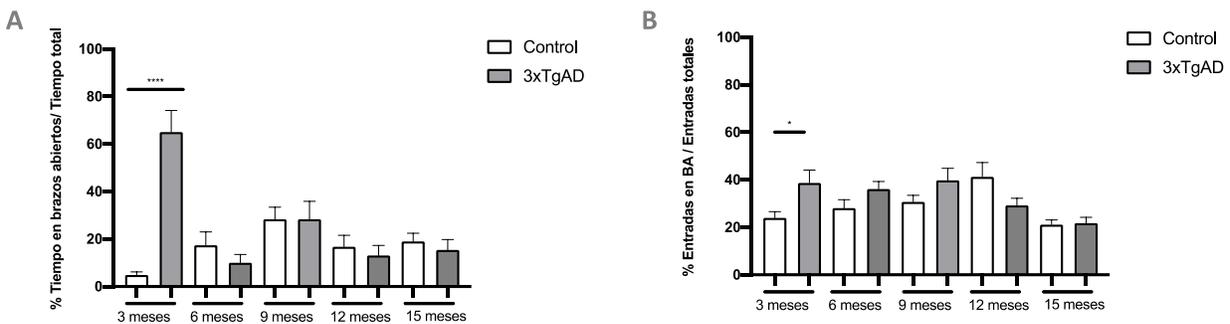


Figura 9. Determinación del nivel de ansiedad en el laberinto elevado. Los resultados muestran una significativa desinhibición en los animales 3xTgAD a los 3 meses de edad en la prueba del laberinto elevado. Se evaluó el porcentaje de tiempo que los animales pasaban en los brazos abiertos frente al tiempo total (A) y el número de entradas que los animales realizaban a dichos brazos frente al número de entradas totales (B). Como se aprecia en el gráfico esta desinhibición es mucho más consistente al medir el tiempo que los animales pasan en los brazos abiertos ($p < 0.0001$) que en el número de entradas a los mismos ($p = 0.03$). Se utilizó la prueba estadística Mann Whitney o T-test para el análisis de los resultados. Los resultados se representan como la media \pm SEM y el análisis estadístico empleado se refiere en la Tabla 1.

Se observó un fenotipo de desinhibición en nuestras ratonas 3xTgAD, que pasaron significativamente más tiempo en los brazos abiertos (Figura 9A) del laberinto elevado que sus homólogas controles así como hicieron un mayor número de entradas a dichos brazos (Figura 9B). Esta desinhibición se observó únicamente a los 3 meses de edad, desapareciendo a partir de los 6 meses de edad.

Para poder corroborar nuestros resultados llevamos a cabo un estudio similar empleando la prueba de campo abierto u OF (ver Tabla 2 y figura 10).

Tabla 2. Datos del análisis estadístico de la prueba de OF. En la tabla se representa la significancia estadística, la prueba paramétrica/no paramétrica empleada y los identificadores estadísticos de dicha prueba.

DISTANCIA RECORRIDA				
	P	Test	T, df	Mann Whitney U
3 meses	0,71	T test	t=0.3796, df=22	
6 meses	0,08	T test	t=1.829, df=18	
9 meses	0,41	T test	t=0.8356, df=20	
12 meses	0,56	Mann Whitney		56
15 meses	0,23	T test	t=1.251, df=12	
% TIEMPO EN PERIFERIA				
	P	Test	T, df	Mann Whitney U
3 meses	0.55	Mann Whitney		61
6 meses	0.04 (*)	T test	t=2.204, df=17	
9 meses	0.12	Mann Whitney		31.50
12 meses	0.40	Mann Whitney		47
15 meses	0.77	T test	t=0.3030, df=12	
% TIEMPO EN CENTRO				
	P	Test	T, df	Mann Whitney U
3 meses	0.24	Mann Whitney		51
6 meses	0.49	T test	t=0.6964, df=19	
9 meses	0.14	Mann Whitney		37.50
12 meses	0.93	Mann Whitney		64
15 meses	0.43	T test	t=0.8206, df=12	
% TIEMPO EN ZONA MEDIA				
	P	Test	T, df	Mann Whitney U
3 meses	0,31	Mann Whitney		54
6 meses	0,42	Mann Whitney		42
9 meses	0,10	Mann Whitney		30
12 meses	0,38	Mann Whitney		51
15 meses	0,27	T test	t=1.161, df=12	

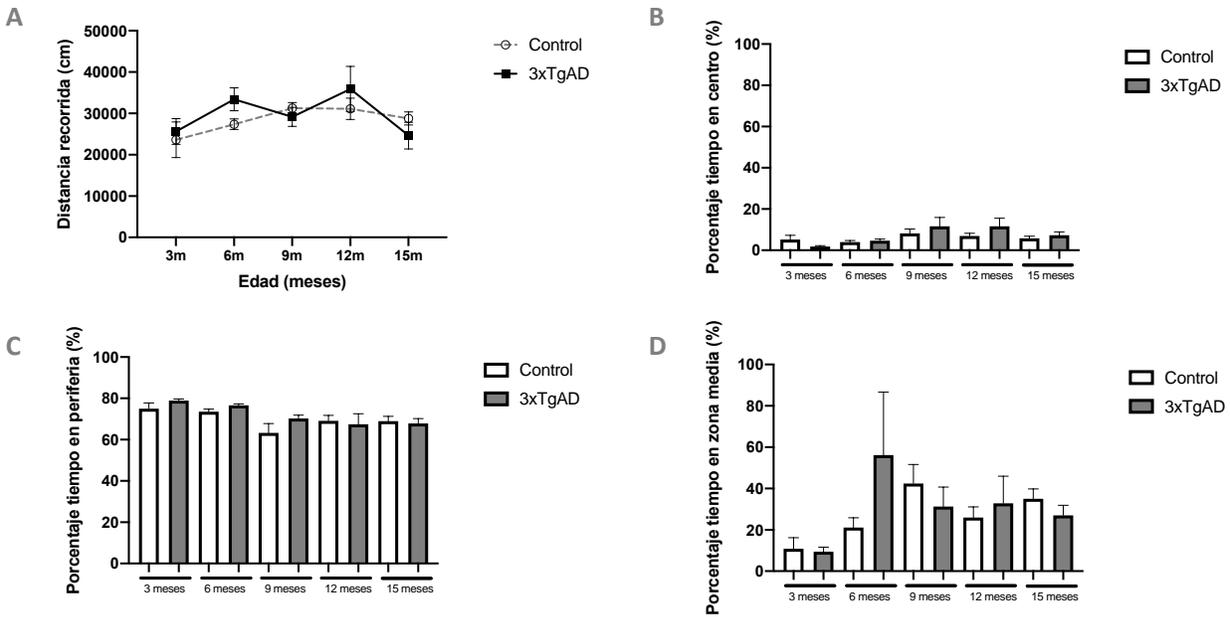


Figura 10. Determinación del nivel de ansiedad en la prueba de campo abierto En la prueba de OF no se observaron diferencias significativas ni en la distancia recorrida (A) ni en el porcentaje de tiempo que los animales pasaban en la periferia (B) o en el centro del laberinto (C). Se utilizó la prueba estadística Mann Whitney o T-test para el análisis de los resultados. Los resultados se representan como la media \pm SEM y el análisis estadístico empleado se refiere en la Tabla 2.

Los resultados obtenidos muestran que, en el caso de la prueba de OF, no existen diferencias significativas entre ambos grupos en ninguno de los marcos temporales estudiados. Todos los animales pasan significativamente más tiempo en la periferia y en la zona media que en el centro del laberinto.

Las diferencias obtenidas en los resultados de ambas pruebas sugerirían que la prueba de campo abierto presenta una menor sensibilidad y especificidad a los cambios ansiogénicos

experimentados en el modelo 3xTgAD que la prueba del laberinto elevado. Aunque este aspecto será posteriormente discutido ampliamente en la discusión del presente manuscrito.

3.1.2. Objetivo 1.2. Determinar las alteraciones en la memoria de reconocimiento de objetos entre los 3-15 meses de edad en el modelo 3xTgAD.

Para llevar a cabo nuestro objetivo empleamos la prueba de reconocimiento de objetos novedosos que permite determinar las alteraciones en la memoria a largo plazo (Figura 8). En esta prueba medimos el tiempo que cada animal permanecía explorando un objeto (familiar) y un objeto novedoso (ver tabla 3 y Figura 11).

Tabla 3. Datos del análisis estadístico de la prueba de reconocimiento de objetos. En la tabla se representa la significancia estadística, la prueba paramétrica/no paramétrica empleada y los identificadores estadísticos de dicha prueba.

	P	Test	T, df	Mann Whitney U
Control 3 meses Fam/Novel	0.0461 (*)	T test	t=2.114, df=22	
3xTgAD 3 meses Fam/Novel	0.0360 (*)	T test	t=2.249, df=20	
Control 6 meses Fam/Novel	0.0482 (*)	T test	t=2.119, df=18	
3xTgAD 6 meses Fam/Novel	0.1135 (ns)	Mann Whitney		44
Control 9 meses Fam/Novel	0.0004 (***)	T test	t=4.144, df=24	
3xTgAD 9 meses Fam/Novel	0.0037 (**)	T test	t=3.399, df=16	
Control 12 meses Fam/Novel	0.0029 (**)	Mann Whitney		12
3xTgAD 12 meses Fam/Novel	0.0004 (***)	Mann Whitney		10
Control 15 meses Fam/Novel	0.0384 (*)	T test	t=2.256, df=16	
3xTgAD 15 meses Fam/Novel	0.0400 (ns)	Mann Whitney		17

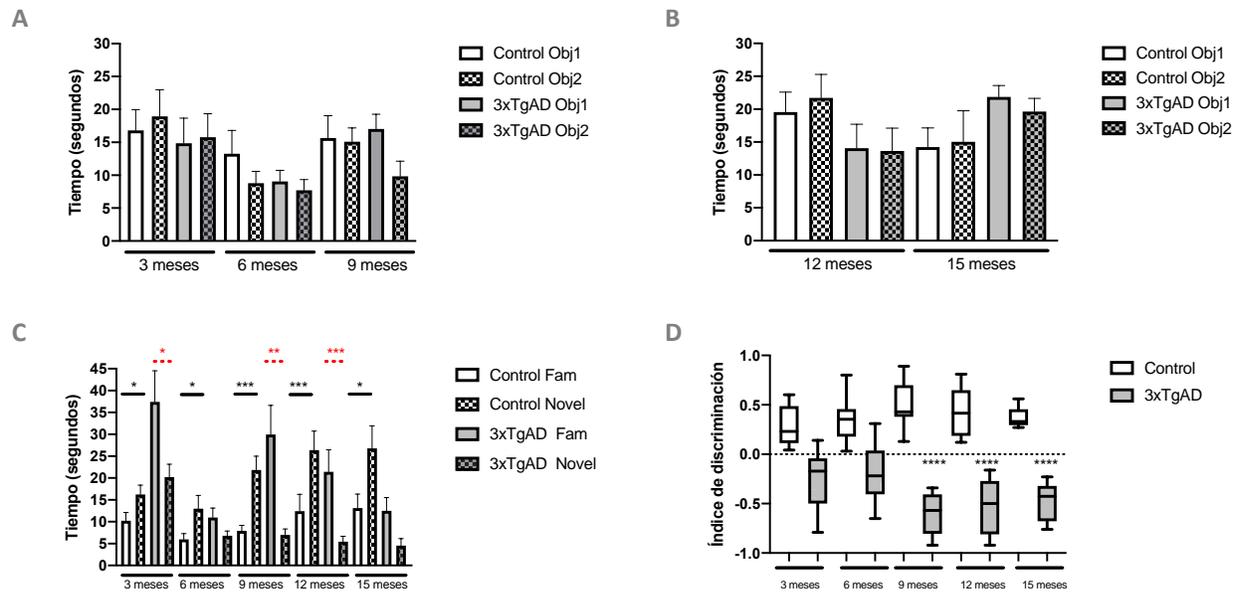


Figura 11. Prueba de reconocimiento de objetos novedosos. Los resultados muestran que los animales realizaron correctamente la fase de familiarización a los 3,6,9 (A), 12 y 15 meses (B). En la fase de prueba de reconocimiento de los objetos novedosos los controles realizaron correctamente la tarea con un aumento significativo en el tiempo que pasaron en contacto con el objeto novedoso (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$), mientras que los animales transgénicos a los 3, 9 y 12 meses olfatearon más el objeto familiar que el novedoso (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$) (C). Se muestra un índice de discriminación significativamente disminuido (**** $p < 0.001$) en los animales 3xTgAD a partir de los 9 meses y hasta los 15 meses (D). Se utilizó la prueba estadística Mann Whitney o T-test para el análisis de los resultados. Los resultados se representan como la media \pm SEM y el análisis estadístico empleado se refiere en la Tabla 3.

A pesar de cierta heterogeneidad en los resultados, se observó que los animales realizaron correctamente la fase de familiarización (figura 11A y 11B). Los valores de discriminación de objetos se representan mediante el índice de discriminación. En este índice, un valor positivo indica más tiempo de investigación del objeto nuevo, cero que se ha pasado el mismo tiempo con ambos objetos y negativo que se ha pasado más tiempo con el objeto familiar. Se observó que, aunque desde los tres meses existe una tendencia a una menor discriminación en los 3xTgAD,

desde los 9 meses las diferencias fueron significativas frente a las ratonas control persistiendo a los 15 meses (figura 11D).

3.1.3. Objetivo 1.3. Determinar las alteraciones en el reconocimiento social entre los 3-15 meses de edad.

Aunque las alteraciones cognitivas han sido ampliamente estudiadas en pacientes con EA, pocos estudios han abordado los factores que desencadenan las alteraciones en la memoria emocional y el reconocimiento social. Se sabe que la memoria emocional genera cognición y se procesa sobre todo en la amígdala y en la corteza orbitofrontal, correlacionando con las principales áreas afectadas en la EA. Para evaluar la memoria emocional evaluamos el efecto de la exposición a la prueba de las 3 cámaras (3-chamber test) para una prueba de discriminación de objetos frente a conespecíficos (10 min), seguida 20 min después por una prueba de discriminación de conespecíficos familiares frente a individuos novedosos (10 min) (ver tabla 4 y figura 12).

Tabla 4. Datos del análisis estadístico de la prueba de reconocimiento social. En la tabla se representa la significancia estadística, la prueba paramétrica/no paramétrica empleada y los identificadores estadísticos de dicha prueba.

SOCIALIZACIÓN				
	P	Test	T, df	Mann Whitney U
Control 3 meses Objeto/Conespecífico	0,028 (*)	T test	t=2,351, df=22	
3xTgAD 3 meses Objeto/Conespecífico	0,027 (*)	T test	t=2,374, df=22	
Control 6 meses Objeto/Conespecífico	0,0006 (***)	Mann Whitney		11
3xTgAD 6 meses Objeto/Conespecífico	0,69	T test	t=0,3975, df=22	
Control 9 meses Objeto/Conespecífico	<0,0001 (****)	Mann Whitney		0
3xTgAD 9 meses Objeto/Conespecífico	0,95	T test	t=0,06003, df=15	
Control 12 meses Objeto/Conespecífico	<0,0001 (****)	Mann Whitney		3
3xTgAD 12 meses Objeto/Conespecífico	0,24	Mann Whitney		42
Control 15 meses Objeto/Conespecífico	<0,0001 (****)	Mann Whitney		4
3xTgAD 15 meses Objeto/Conespecífico	0,0830	Mann Whitney		15

DISCRIMINACIÓN SOCIAL				
	P	Test	T, df	Mann Whitney U
Control 3 meses Fam/Novel	0,02	Mann Whitney		21
3xTgAD 3 meses Fam/Novel	0,67	T test	t=0,4350, df=22	
Control 6 meses Fam/Novel	<0,0001 (****)	T test	t=5,028, df=20	
3xTgAD 6 meses Fam/Novel	0,40	T test	t=0,8570, df=22	
Control 9 meses Fam/Novel	0,0008	T test	t=3,941, df=20	
3xTgAD 9 meses Fam/Novel	0,83	T test	t=0,2152, df=16	
Control 12 meses Fam/Novel	<0,0001 (****)	T test	t=7,026, df=22	
3xTgAD 12 meses Fam/Novel	<0,0001 (****)	T test	t=9,176, df=20	
Control 15 meses Fam/Novel	<0,0001 (****)	Mann Whitney		0
3xTgAD 15 meses Fam/Novel	<0,0001 (****)	T test	t=6,415, df=16	

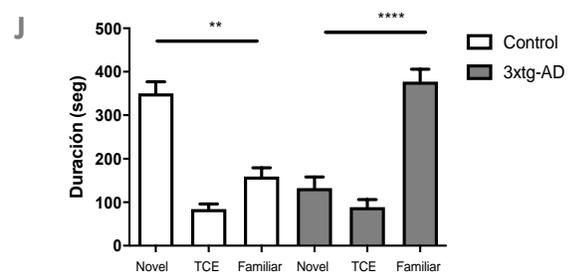
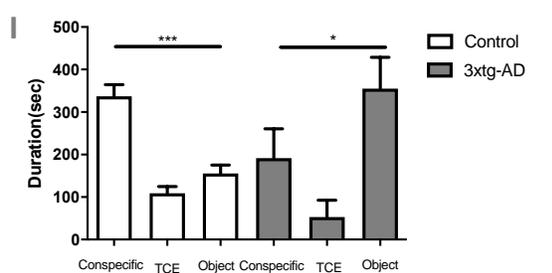
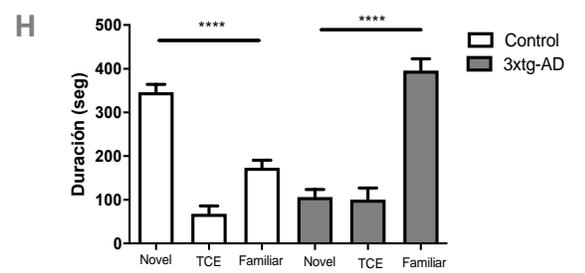
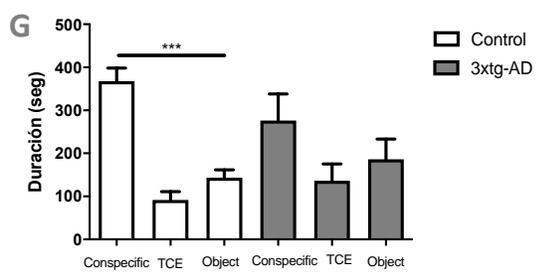
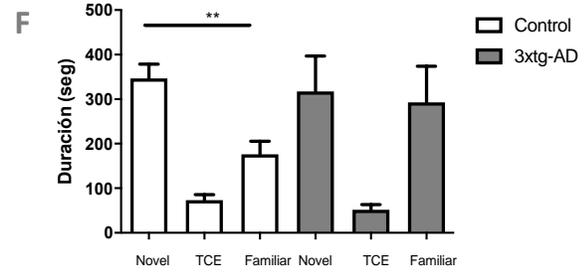
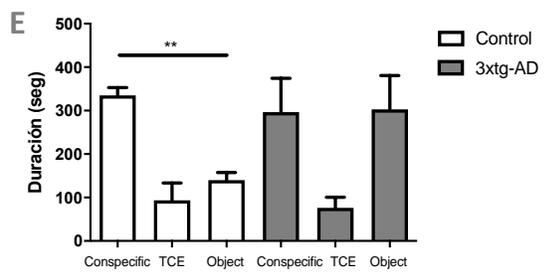
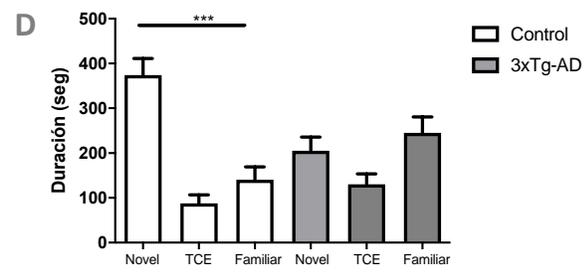
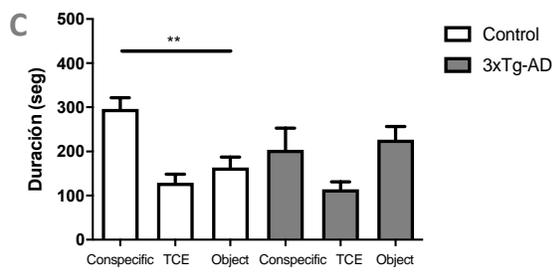
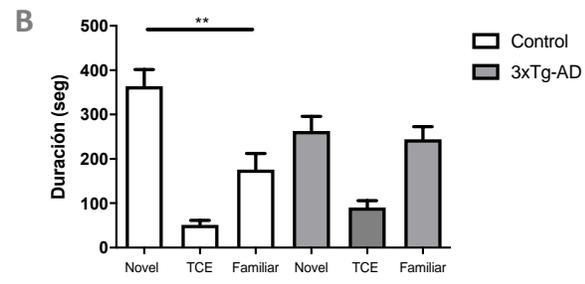
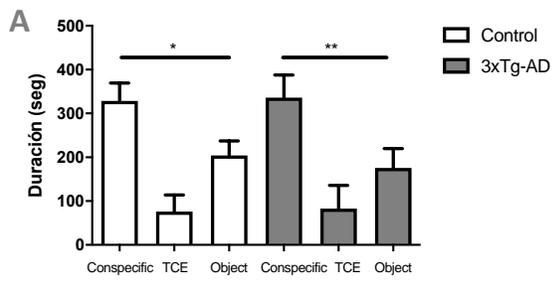


Figura 12. Prueba de sociabilidad y reconocimiento social. Se muestran los resultados del tiempo explorando un conoespecífico, el centro o un objeto (prueba de sociabilidad; paneles: A,C,E,G e I) y el tiempo explorando el conoespecífico anterior y un individuo novedoso (reconocimiento social; paneles: B, D, F, H y J). Se representan los resultados a los 3 (A-B), 6 (C-D), 9 (E-F), 12 (G-H), y 15 meses de edad (I-J). (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$) conoespecíficos (10 min), seguida 20 min. Se utilizó la prueba estadística Mann Whitney o T-test para el análisis de los resultados. Los resultados se representan como la media \pm SEM y el análisis estadístico empleado se refiere en la Tabla 4.

En relación con la sociabilidad, a los 3 meses, el tiempo transcurrido en las distintas cámaras fue significativamente diferente entre los grupos (ANOVA de una vía, $F(5, 66) = 10.06$, $p < 0.0001$). Un análisis Bonferroni post-hoc de los datos reveló que las ratonas de ambos grupos pasaron significativamente más tiempo en la cámara que contenía el conoespecífico que en la que contenía el objeto. De igual manera existían diferencias intergrupales a los 6 (ANOVA de una vía, $F(5, 63) = 5.113$, $p = 0.0005$), 9 (ANOVA de una vía, $F(5, 54) = 8.153$, $p < 0.0001$), 12 (ANOVA de una vía, $F(5, 60) = 7.013$, $p < 0.0001$) y 15 meses (ANOVA de una vía, $F(5, 54) = 10.16$, $p < 0.0001$). El post análisis mostró que las ratonas del grupo control pasaban más tiempo con el conoespecífico que con el objeto, no así las 3xTgAD que no discriminaban entre ambas o, como fue el caso de las ratonas de 15 meses, significativamente visitaban más al objeto que al conoespecífico.

En cuanto a la discriminación social, existen diferencias intergrupales a los 3 (ANOVA de una vía, $F(5, 66) = 16.65$, $p < 0.0001$), los 6 (ANOVA de una vía, $F(5, 63) = 11.79$, $p < 0.0001$), 9 (ANOVA de una vía, $F(5, 55) = 7.912$, $p < 0.0001$), 12 (ANOVA de una vía, $F(5, 63) = 51.70$, $p < 0.0001$) y 15 meses (ANOVA de una vía, $F(5, 54) = 35.63$, $p < 0.0001$). Un análisis Bonferroni post-hoc de los datos reveló que las ratonas del grupo control pasaban significativamente más tiempo con el individuo nuevo que con el familiar (Figura 12B-J), no así las 3xTgAD que no discriminaban entre

ambas (Figura 12B-F) o, como fue el caso de las ratonas de 12 y 15 meses, significativamente visitaban más al familiar que al nuevo (Figura 12 H-12J).

3.2. OBJETIVO 2. DETERMINAR LA FUNCIONALIDAD DE LA AMÍGDALA EN DIFERENTES ESTADIOS DE LA PATOLOGÍA TIPO ALZHEIMER EN ANIMALES 3xTg-AD.

Se ha utilizado la técnica de inmunohistoquímica para examinar c-fos y ver la activación neuronal de la amígdala y la corteza piriforme en diferentes edades de los animales 3xtg-AD y controles. El inmunomontaje de c-fos se expresó como la proporción neuronal de los núcleos tanto de la amígdala como de la corteza piriforme, teñidos dentro del núcleo cerebral del animal en condiciones basales, tras el sacrificio posterior a la realización de la tarea de 3-chambe . Para nuestro estudio analizamos la corteza piriforme (Pir), la amígdala medial (MeA), el área de transición cortico-amígdala (CxA) y el núcleo amigdalino cortical (Aco) (ver Tabla 5, Figura 13 y Figura 14).

Tabla 5. Datos del análisis estadístico del marcaje de células c-fos en los diferentes núcleos de la amígdala y a los diferentes marcos temporales. En la tabla se representa la significancia estadística, la prueba paramétrica/no paramétrica empleada y los identificadores estadísticos de dicha prueba.

3 meses				
	P	Test	T, df	Mann Whitney U
C-Pir II vs 3xTgAD-Pir II	0.62	T test	t=0.5039, df=10	
C-Pir III vs 3xTgAD-Pir III	0.84	T test	t=0.2064, df=10	
C-MeA vs 3xTgAD-MeA	0.44	T test	t=0.8114, df=10	
C-Aco vs 3xTgAD-Aco	0.60	T test	t=0.5405, df=10	
C-Cx vs 3xTgAD-CxA	0.45	T test	t=0.7859, df=9	
6 meses				
	P	Test	T, df	Mann Whitney U
C-Pir II vs 3xTgAD-Pir II	0.57	T test	t=0.5874, df=9	
C-Pir III vs 3xTgAD-Pir III	0.77	T test	t=0.3014, df=9	
C-MeA vs 3xTgAD-MeA	0.35	T test	t=0.9937, df=9	
C-Aco vs 3xTgAD-Aco	0.72	T test	t=0.3698, df=9	
C-Cx vs 3xTgAD-CxA	0.48	T test	t=0.7445, df=9	
9 meses				
	P	Test	T, df	Mann Whitney U
C-Pir II vs 3xTgAD-Pir II	0.57	T test	t=0.5840, df=9	
C-Pir III vs 3xTgAD-Pir III	0.08	T test	t=1.915, df=9	
C-MeA vs 3xTgAD-MeA	0.02 (*)	T test	t=2.822, df=9	
C-Aco vs 3xTgAD-Aco	0.012 (*)	T test	t=3.157, df=9	
C-Cx vs 3xTgAD-CxA	0.0760	T test	t=2.005, df=9	
12 meses				
	P	Test	T, df	Mann Whitney U
C-Pir II vs 3xTgAD-Pir II	0.62	T test	t=0.5153, df=9	
C-Pir III vs 3xTgAD-Pir III	0.02	T test	t=2.845, df=9	
C-MeA vs 3xTgAD-MeA	0.30	T test	t=1.110, df=8	
C-Aco vs 3xTgAD-Aco	0.18	Mann-Whitney test		7
C-Cx vs 3xTgAD-CxA	0.78	T test	t=0.2909, df=8	
15 meses				
	P	Test	T, df	Mann Whitney U
C-Pir II vs 3xTgAD-Pir II	0.03 (*)	T test	t=2.626, df=7.986	
C-Pir III vs 3xTgAD-Pir III	0.11	T test	t=1.794, df=8	
C-MeA vs 3xTgAD-MeA	0.57	T test	t=0.5877, df=8	
C-Aco vs 3xTgAD-Aco	0.19	T test	t=1.477, df=5.808	
C-Cx vs 3xTgAD-CxA	0.09	T test	t=1.901, df=7.945	

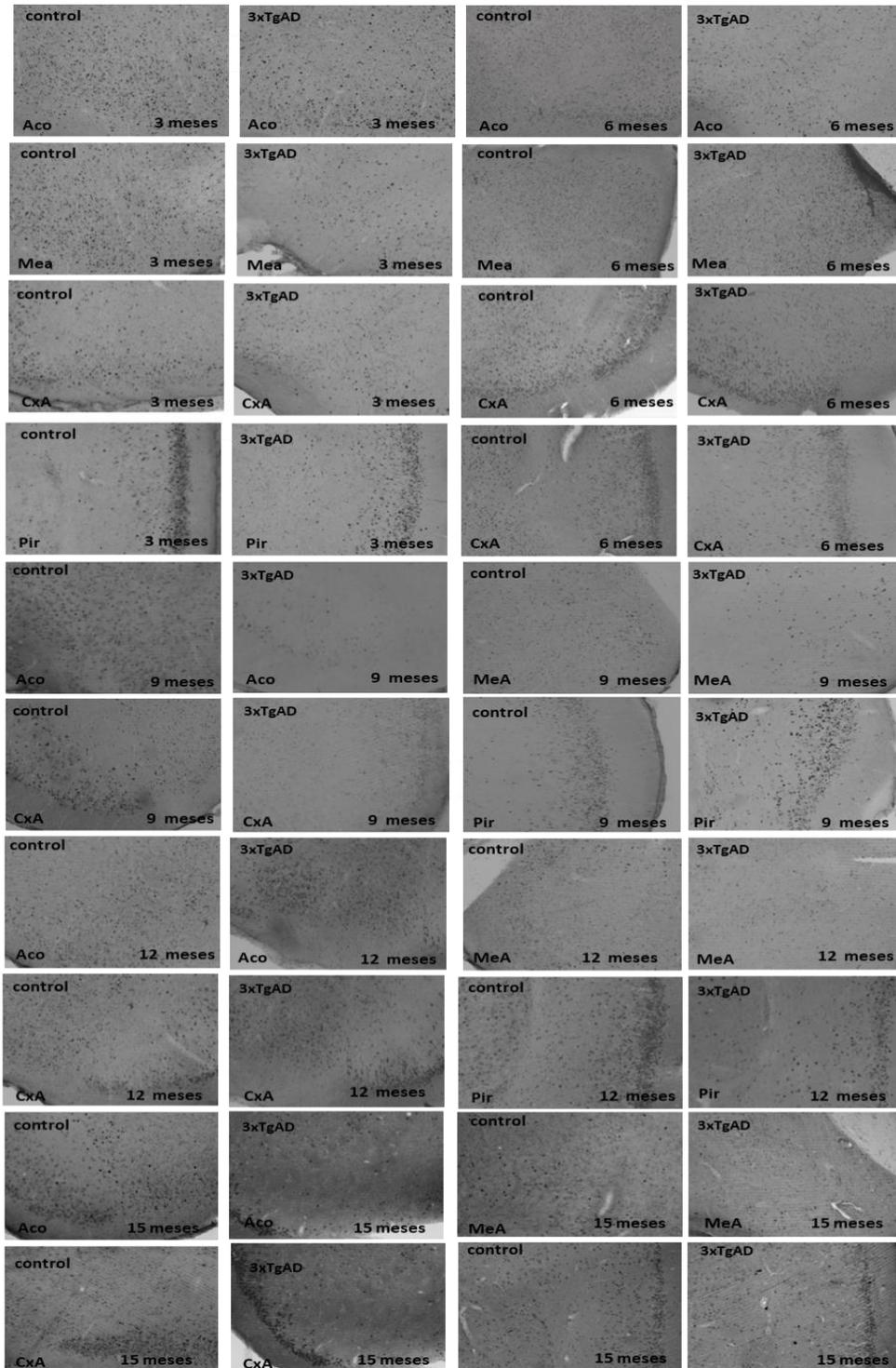


Figura 13. Núcleos de la amígdala y la corteza piriforme. Podemos observar una disminución de la activación neuronal en los animales 3xTg-AD en comparación con los controles en Aco y Mea a los 9 meses, en Pir III a los 12 meses y en Pir II a los 15 meses.

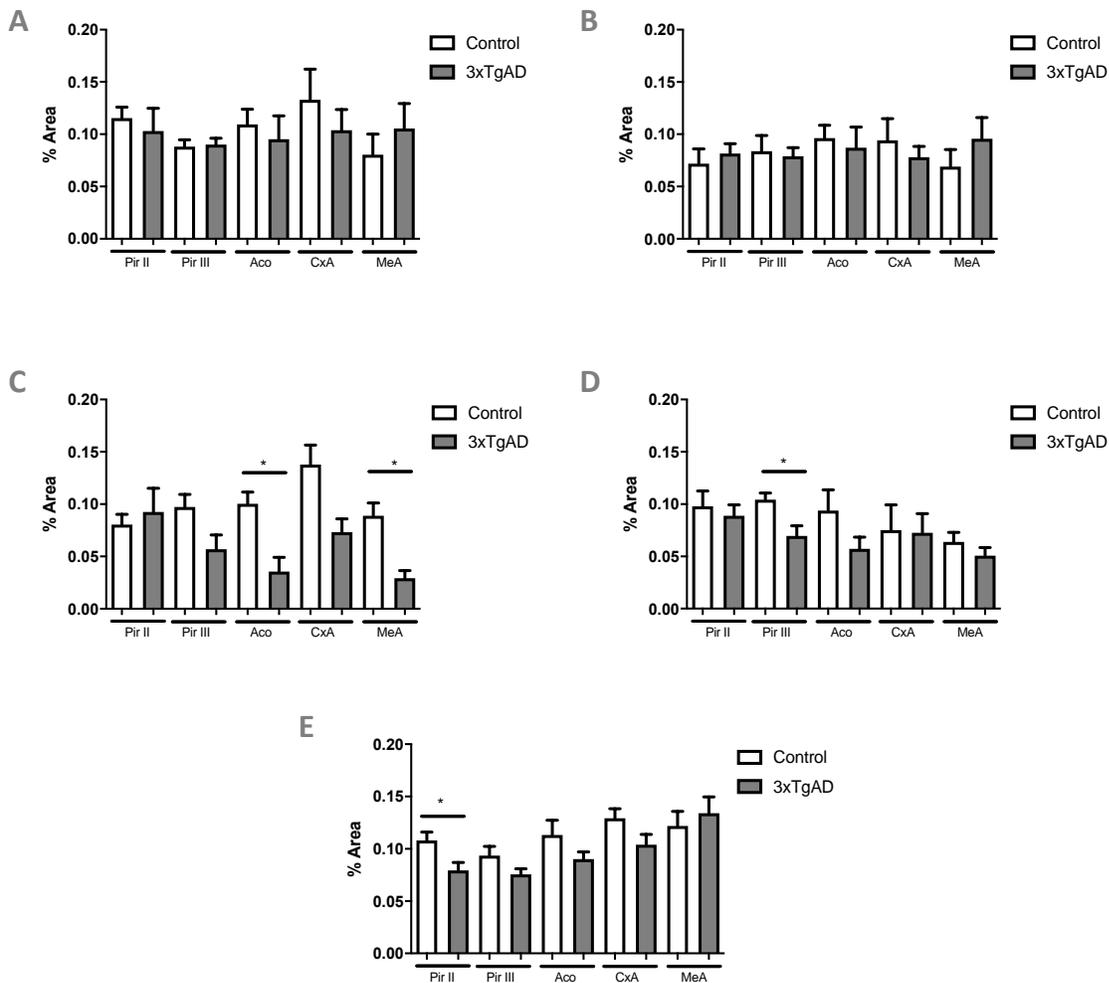


Figura 14. Activación genética temprana e inmediata en áreas relacionadas con el comportamiento social, después de las pruebas de comportamiento. Los resultados se presentan como media \pm SEM y representan el área ocupada por los núcleos inmunopositivos para c-Fos dividida por el área de la región analizada a los 3 (A), 6 (B), 9 (C), 12 (D) y 15 (E) meses (F,G) (* $p < 0,05$). Se utilizó la prueba estadística Mann Whitney o T-test para el análisis de los resultados. Los resultados se representan como la media \pm SEM y el análisis estadístico empleado se refiere en la Tabla 5.

El análisis estadístico mostró que no existían diferencias significativas en los patrones de activación de c-fos entre ambos grupos, control y 3xTgAD a los 3 y 6 meses de edad. La prueba

de t-student para los 9 meses mostró una significativa disminución en el patrón de activación de c-fos a nivel de MeA y Aco en el cerebro de las ratonas 3xTgAD al compararlo con los niveles obtenidos en las áreas respectivas de las ratonas control. El resto de áreas analizadas mostraron una expresión similar de c-fos entre ambos grupos. A los 12 meses se observó igualmente una disminución de la activación neuronal en los animales 3xtg-AD, en comparación con las controles, en el área Pir III a y en Pir II a los 15 meses. A estas edades el resto de núcleos mostraron una actividad similar entre ambos grupos.

4.DISCUSSION

4.1. DISCUSIÓN DEL MODELO UTILIZADO

La evaluación exhaustiva y detallada de todas las características cognitivas y conductuales manifestadas en las demencias es de mucha relevancia para conocer el circuito de la enfermedad, por tal motivo en investigación animal se utilizan diferentes modelos de ratón para su estudio (Giménez-Llort et al., 2007). Los análisis estadísticos relacionados con pruebas de comportamiento animal en diferentes investigaciones con ratones transgénicos de EA, han demostrado la utilidad de este modelo animal para caracterizar la patología de la enfermedad relacionado con el deterioro cognitivo (Leighty et al., 2004). Actualmente existen tres tipos de modelos animales para el estudio de la EA, dependiendo de cómo se origine la fisiopatología de la misma: i) tipo espontáneo, ii) intervención y iii) los modificados genéticamente (Sodhi et al., 2014). El modelo espontáneo es que se origina de manera fisiológica, asociada al envejecimiento, como ocurre en los modelos añosos de primates no humanos, que manifiestan altas concentraciones de tau. El modelo intervencionista es el que requiere de la manipulación postnatal por parte del investigador, como es la introducción de beta amiloide por estereotaxia, que origina depósitos específicos que causan un deterioro cognitivo en el animal. Finalmente, el modelo modificado genéticamente, y usado en este estudio, en el que el animal presenta desde el nacimiento alteraciones genéticas que correlacionan con la EA. Este modelo modificado genéticamente, ampliamente estudiado (Cisternas et al., 2018), difiere de los otros dos modelos en que presenta una clínica más detallada de la EA (Esquerda-Canals et al., 2017).

Entre todos los modelos disponibles para estudiar la EA en animales por modificación genética, para nuestro estudio hemos elegido el 3xtg-AD. Este modelo aún, como ha sido descrito previamente en este manuscrito, por una parte tres genes asociados a la EA familiar (Oddo, Caccamo, Shepherd, et al., 2003), lo que permite estudiar de manera más detallada la

sintomatología que caracteriza a esta enfermedad según se ha descrito en estudios anteriores (Pudelewicz et al., 2019). La fisiopatología reproducida en estos modelos transgénicos de EA no resulta exclusivamente de la introducción de mutaciones patógenas, sino que también existen otros determinantes adicionales que regulan su aparición y desarrollo. Los modelos animales modificados genéticamente, como el 3xTgAD empleado en el presente estudio, se basan en una sobreexpresión de genes humanos. Por tanto, los fenotipos expresados en dichos modelos de la EA están modulados por genes que pueden relacionarse con las respuestas biológicas individuales de cada uno de estos animales que dependan de neuroinflamación, capacidad de aprendizaje y memoria. Por este motivo se justifica la evaluación exhaustiva de dichos determinantes mediante pruebas de comportamiento validadas y justificadas en el modelo murino (Esquerda-Canals et al., 2017).

Por otra parte, no podríamos concluir esta justificación sin mencionar los resultados contradictorios que ha mostrado el modelo 3xTgAD en algunas pruebas de comportamiento. En este sentido, estudios previos han evidenciado un mismo déficit cognitivo en animales de 2 meses y 15 meses (Stevens & Brown, 2015). Estos resultados, lejos de suponer un déficit del modelo, reflejan la necesidad y la importancia de utilizar diferentes paradigmas conductuales que permitan profundizar en el estudio del modelo 3xTgAD en diferentes estadios de edad. De este estudio se derivaría una comprensión de como progresa en dicho modelo el déficit cognitivo, desde las edades tempranas hasta las avanzadas, tal y como se manifiesta finalmente dicha enfermedad en el ser humano.

Por otra parte, todos los animales escogidos son del sexo femenino. Claramente en las investigaciones que emplean el modelo 3xTgAD existe un sesgo hacia los estudios en ratones macho. Sin embargo, se sabe que la edad, la apolipoproteína E ϵ 4 (APOE) y el sexo cromosómico

son factores de riesgo bien establecidos para la LOAD (Riedel et al., 2016). Más del 60% de las personas con EA albergan al menos un alelo APOE-ε4 y la prevalencia de la EA en función del sexo está bien documentada, ya que, de igual manera, más del 60% de las personas con EA son mujeres (Snyder et al., 2016).

Aunque los efectos del sexo en la epidemiología de la EA son actualmente objeto de una intensa investigación, la noción de fenotipos clinicopatológicos de la EA específicos del sexo está en gran medida inexplorada. La evidencia acumulada indica patrones específicos de sexo en la manifestación de la enfermedad, así como diferencias de sexo en las tasas de deterioro cognitivo y atrofia cerebral, lo que sugiere que el sexo es una variable crucial en la heterogeneidad de la enfermedad (Ferretti et al., 2018). En definitiva el esclarecimiento de las diferencias de sexo en los fenotipos de la enfermedad será fundamental para el desarrollo de un enfoque de "medicina de precisión" en la EA, que abarque estrategias individuales, multimodales, basadas en biomarcadores y sensibles al sexo para la prevención, la detección, el desarrollo de fármacos y el tratamiento de la enfermedad.

Este esclarecimiento debe partir de la base de potenciar estudios en modelos animales que abarquen un mayor conocimiento sobre el sexo cromosómico predominante en la enfermedad, esto es, en animales hembra.

4.2. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN LA VALORACIÓN ANSIOGÉNICA DEL MODELO 3XTGAD.

A día de hoy está plenamente aceptado que los depósitos cerebrales A β , la pérdida neuronal y el deterioro cognitivo son los principales hallazgos o características, junto con los depósitos de proteína tau y la neuroinflamación, clave de la EA (Jack et al., 2018). En relación con estos cambios, síntomas neuropsiquiátricos como la apatía, la depresión y la ansiedad parecen desempeñar un efecto modulador. En este sentido, se ha demostrado que tanto la apatía como la ansiedad se asocian con la acumulación cerebral de A β así como con el deterioro cognitivo progresivo, mientras que los niveles bajos de ansiedad interactúan con el procesamiento de A β siendo un factor predictivo de un deterioro cognitivo más rápido (Johansson et al., 2020).

Hipóticamente, la ansiedad en la EA temprana podría desarrollarse debido a que la patología de la EA interrumpe las funciones límbicas. Otra posibilidad es que la ansiedad se suma al deterioro cognitivo al interrumpir los procesos cognitivos prefrontales (Eysenck et al., 2007). La ansiedad también puede aumentar los niveles de cortisol, provocando un estrés neurotóxico en el hipocampo, causando un declive cognitivo aún mayor (Erickson et al., 2003). Se ha postulado, en este sentido, que todos estos mecanismos podrían reforzarse mutuamente en bucles de retroalimentación, abriendo la posibilidad de explorar intervenciones dirigidas a la ansiedad como una forma potencial de desacelerar el deterioro cognitivo. Alternativamente, la ansiedad podría también representar una reacción psicológica al empeoramiento de la función cognitiva en los primeros estadios de la EA temprana (Johansson et al., 2020).

Para evaluar el estado de ansiedad o ansiogénico de nuestras ratonas 3xTgAD empleamos dos pruebas de comportamiento, por una parte, la prueba del laberinto elevado y por otra la prueba del campo abierto.

4.2.1. Evaluación de los resultados obtenidos en la prueba de laberinto elevado

La prueba del laberinto elevado ha sido está ampliamente validada en la comunidad científica como una herramienta eficaz para estimar la ansiedad de los modelos animales (Carola et al., 2002; Rodgers & Dalvi, 1997).

Al evaluar el patrón temporal de las alteraciones patológicas y conductuales en estos animales en relacion con el nivel de ansiedad por medio de la prueba de laberinto elevado encontramos que solo a los 3 meses de edad los animales 3xtg-AD han estado más tiempo en los brazos abiertos que en los cerrados en relacion a sus homologas controles, datos que correlacionan con los encontrados por (Pairojana et al., 2021) en la muestra de 3 meses de edad en sus ratonas transgénicas. Sin embargo, en este mismo estudio, se hallaron diferencias significativas a estadios más avanzados. A las edades de 9 y 12 meses este grupo observó que las ratonas pasaban más tiempo en los brazos abiertos que en los cerrados (Pairojana et al., 2021). Esta discrepancia de resultados se puede atribuir al tamaño muestral, siendo nuestra muestra más amplia y homogénea en sus resultados. Por otro lado, los resultados obtenidos concuerdan con estudios previos en los que no se observaron diferencias significativas en el tiempo de las entradas en brazos abiertos y brazos cerrados en edades más avanzadas (Filali et al., 2012; Sterniczuk, Antle, et al., 2010). Por los resultados obtenidos, se puede decir que en relación con la prueba del laberinto elevado y el modelo 3xTgAD es primordial la edad de evaluación (Belfiore et al., 2019), ya que en las primeras edades en relacion con la EA en humanos es la etapa más leve de la enfermedad, en la cual el

paciente se encuentra en el proceso de la pérdida de sus facultades cognitivas y emocionales lo que podría generar un aumento de su estado de ansiedad.

4.2.2. Evaluación de los resultados obtenidos en la prueba de campo abierto.

Al realizar la prueba de OF en nuestro estudio no encontramos diferencias significativas entre los animales 3xTgAD y las ratonas control. Estos datos que se pueden correlacionar con los obtenidos en estudios previos (St-Amour et al., 2014; Torres-Lista et al., 2017).

A diferencia de nuestro estudio los datos obtenidos por (Chiquita et al., 2019) muestran una reducción a nivel motor en la distancia y la velocidad recorrida por ratonas 3xtg-AD a partir de los 4 meses de edad hasta los 16 meses en comparación con los controles ,con excepción de sus animales de 12 meses de edad en los cuales al igual que nosotros no encontraron diferencias significativas. Esta discrepancia puede ser atribuida al menor tamaño muestral de estos estudios, y a que nosotros hemos estimado las diferencias en locomoción valorando la distancia recorrida en total mientras que estos estudios la estiman en tramos más cortos, aunque la distancia total no difiera entre ambos grupos, de igual manera ninguno de estos estudios emplea en exclusiva el modelo de hembras 3xTgAD (Arsenault et al., 2011; Halagappa et al., 2007; Pietropaolo et al., 2009). De igual forma también se podría decir que la falta de motivación en estos animales de realizar la conducta de exploración en estas pruebas podría ser por el daño cerebral ocurrido en áreas del sistema límbico como se ha visto en estudios anteriores de (Belfiore et al., 2019; Filali et al., 2012; Oddo, Caccamo, Shepherd, et al., 2003).

En general el comportamiento tanto los animales control como los animales 3xTgAD difiere de lo esperado, ya que en ambos grupos se presenta un mayor estado de ansiedad (mayor porcentaje de

tiempo en la periferia) de lo esperable. Todo lo anteriormente comentado puede representar una menor sensibilidad, en nuestro estudio, en la valoración del estado de ansiedad de nuestros animales en comparación con la prueba del laberinto elevado. Se precisan por tanto más estudios empleando la prueba de OF en el modelo 3xTgAD.

4.3. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN LAS ALTERACIONES EN LA MEMORIA DE RECONOCIMIENTO DE OBJETOS EN EL MODELO 3xTgAD.

Como habíamos mencionado anteriormente el deterioro cognitivo y funcional en estos animales depende de la edad (Belfiore et al., 2019). Estudios previos señalan que, a partir de los 2 meses de edad, ya se puede evidenciar deterioro de la memoria de trabajo y de referencia en estos animales (Stevens & Brown, 2015). Sin embargo esto se contradice con estudios previos que marcan los 4 meses de edad como el marco temporal en el que se pueden observar problemas cognitivos en estos animales, existiendo un déficit en la memoria a largo plazo a partir de los 4 meses de edad y un problema de retención de la información de la memoria a corto plazo a partir de los 6 meses de edad en modelo 3xTgAD (Belfiore et al., 2019; Billings et al., 2005; Giménez-Llort et al., 2007).1.

Como se ha presentado en estudios anteriores la memoria es una de las funciones cognitivas que se ve afectada en el paciente que padece de la EA, siendo unos de los primeros síntomas que padece el paciente (Jahn, 2019). Es importante señalar que en humanos se accede a la memoria por medio

del lenguaje escrito o hablado, sin embargo en los animales se debe acceder por medio de diferentes comportamientos específicos relacionados con el aprendizaje y la memoria (Antunes & Biala, 2012). En el estudio del comportamiento animal la prueba del NORT se basa en un comportamiento innato de un roedor a un estímulo novedoso, en ausencia de reglas o esfuerzos (Ennaceur & Delacour, 1988), estableciendo un correlato con lo observado en el paciente con EA, es una de las principales pruebas para medir la amnesia en los animales (Baxter, 2010). La prueba del NORT nos permite evaluar en el animal la memoria a corto, medio y largo plazo dependiendo del intervalo de retención empleado (Tagliabata et al., 2009).

Para nuestro estudio hemos empleado un protocolo que evalúa la memoria a corto-medio plazo puesto que entre el primer ensayo, en la cual el animal explora dos objetos iguales y el segundo ensayo, en el que uno de los objetos se le cambia por otro diferente, el tiempo es de 30 minutos (Cohen & Stackman, 2015).

En nuestro estudio no hemos encontrado diferencias en la fase de familiarización, pasando los animales de ambos grupos el mismo tiempo con cada uno de los objetos que se les presentaba por primera vez, por lo que ningún animal fue descartado por mostrar una significativa preferencia por alguno de los objetos. En cambio, en la fase de test, cuando a los animales se les presentaba un objeto diferente se evidenciaron diferencias entre ambos grupos. Mientras los animales del grupo control discriminaban perfectamente entre ambos objetos, evidenciando, como era de esperar, una significativa preferencia por el objeto novedoso frente al familiar en todos los marcos temporales analizados, los animales 3xTgAD mostraron alteraciones desde los primeros estadios. El análisis de dichos resultados evidenció que desde los 3 meses de edad hasta los 15 meses de edad los animales 3xTgAD fueron incapaces de discriminar entre ambos objetos. Paradójicamente a los 3, 9 y 12 meses mostraron una mayor preferencia por el objeto familiar frente al objeto novedoso.

Estas diferencias fueron más evidentes a partir de los 9 meses, tal y como indica el índice de discriminación. Estos resultados concuerdan con estudios previos que mostraban, aunque en hembras 3xTgAD de mayor edad, 12-14 meses, una deficiencia significativa en el reconocimiento de objetos novedosos (Filali et al., 2012). De igual manera estos resultados se correlacionan con el déficit cognitivo observado en otros estudios que emplean este modelo (Arsenault et al., 2011; Clinton et al., 2007). Por el contrario, otros estudios (Stover et al., 2015) no han mostrado estas diferencias en el reconocimiento de objetos. La principal causa de esta discrepancia en los resultados obtenidos se basa en la muestra empleada. Este estudio empleó una muestra en un único marco temporal, a los 6,5 meses de edad, y homogeneizaron en el mismo grupo de estudio a machos y hembras en el estudio. Recordemos que en cada etapa temporal de estos animales las manifestaciones de los déficits cognitivos se presentan de manera distinta a medida que avanza la patología, no existiendo en la literatura evidencias del deterioro en esta tarea antes de esta edad. Si bien es cierto que en nuestro caso observamos diferencias a esta edad, en que los animales 3xTgAD mostraban una preferencia igual por ambos objetos, el índice de discriminación reveló que dichas diferencias no eran significativas o atribuibles a un comportamiento alterado.

En definitiva lo que mostramos en este apartado es que las ratonas 3xTgAD mostraban un deterioro cognitivo en la memoria de reconocimiento de objetos a partir de los 9 meses de edad, y hasta los 15 meses estudiados.

4.4. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN LAS ALTERACIONES DE LA MEMORIA SOCIAL DEL MODELO 3xTgAD.

Aunque existen numerosas investigaciones que han evaluado los aspectos cognitivos en el paciente con EA, el reconocimiento social y la memoria emocional no han sido objeto de significativos estudios. En humanos estudios previos indican que la amígdala es crucial en el procesamiento social (Killgore & Yurgelun-Todd, 2005; Kwak et al., 2018), al igual que ocurre en modelos animales (Ferguson et al., 2001; Tanimizu et al., 2017). En vista de la ausencia de estudios relevantes en modelos murinos de EA, hemos usado la prueba de 3-chamber-room, para valorar las alteraciones en la memoria social y la memoria emocional en el modelo 3xtg-AD. Así mismo, este paradigma conocido como el protocolo de preferencia social, estudia la afiliación social y memoria social, habiendo sido empleado en estudios anteriores en ratones endogámicos y mutantes (Kaidanovich-Beilin et al., 2010).

Mediante esta prueba evaluamos tanto la sociabilidad como la discriminación social. En el caso de la sociabilidad, alteraciones en la misma fueron observadas desde los 6 meses de edad. Los animales 3xTgAD desde este marco temporal fueron incapaces de reconocer o discriminar entre el objeto y un animal señuelo. En cuanto a la discriminación social ya desde los 3 meses de edad, el grupo de los animales transgénicos era incapaz de discriminar entre una individuo novedosa y la familiar (prueba de discriminación social), a la que ya había visto antes en la prueba de socialización. Ya en edades más avanzadas 12 y 15 meses de edad, que se relacionan con los estadios más avanzados en la EA, se observó incluso una mayor preferencia por el individuo familiar que por el novedoso.

Revisando la literatura existente, no existen muchos estudios que evalúen la memoria social en animales 3xtg-AD con esta prueba. Existe un único estudio, con este modelo de EA, en el que se analizó el comportamiento social y su relación con el nivel de estrés endocrino y su posible efecto en la memoria social, a los de 4-6 meses de edad . En dicho estudio ambos grupos, tanto controles como 3xTgAD, realizaron correctamente la prueba de sociabilidad, pasando más tiempo con el animal novel que con el objeto (Nguyen et al., 2020). Nuevamente, los datos presentados se basan en un tamaño muestral menor que el de nuestro estudio. En cambio, sus resultados obtenidos en la prueba de discriminación social concuerdan con los que nosotros obtuvimos, las ratonas 3xtg-AD no discriminaron entre en ratón novel y el familiar.

Otros estudios relevantes han empleado este paradigma comportamental pero con otro modelo animal transgénico de EA, en este caso el modelo murino APPse swe/ PS1 (Cheng et al., 2014; Filali et al., 2011; Poppe et al., 2019). El primer estudio referido, se emplearon animales transgénicos machos de la línea APPse swe/ PS1 a los 10 meses de edad, para evaluar la propiedades preventivas del tratamiento con cannabidiol (CBD) (Cheng et al., 2014). La evaluación de la memoria social con la prueba de 3-chamber-room mostró que, a excepción de los APPxPS1, todos los grupos fueron capaces de discriminar entre el ratón familiar y el ratón novel. Estos resultados apoyarían los obtenidos en nuestro estudio entre los 9 y los 15 meses de edad.

En cuanto al trabajo de Filali y cols., sus resultados al evaluar la memoria social en animales machos de 6 meses de edad muestran, en el caso de la sociabilidad, un patrón normal en los animales control, mientras que los animales APPse swe/ PS1 no discriminaron entre objeto y animal (Filali et al., 2011). Estos datos se correlacionan con los obtenidos a la misma edad en nuestros animales 3xTg-AD. Por otro lado, al realizar la prueba de discriminación social, se

encontró, en este mismo estudio, una mayor preferencia de los animales APPse swe/ PS1 por el ratón familiar que por el ratón novel (Filali et al., 2011). Estos datos concuerdan con los obtenidos en nuestro estudio en edades avanzadas, entre 12 y 15 meses de edad, pero no así a entre los 3-9 meses, donde los animales de nuestro estudio pasaron un tiempo equivalente con ambos animales (novel y familiar). Estos resultados pueden ser atribuibles a la diferente línea transgénica, pudiendo estar la memoria social más alterada a etapas más tempranas en el modelo APPse swe/ PS1 que en el 3xTgAD o bien por el género (machos frente a las hembras de nuestro estudio) o el menor tamaño muestral del estudio de Filali y cols.

Finalmente, y continuando con las investigaciones de la memoria social en modelos de EA, el grupo de Poppe y cols., utilizó animales APPse swe/ PS1 de 9 meses de edad para estudiar el papel del receptor AphA4 en la mediación y señalización sináptica en el hipocampo (Poppe et al., 2019). La evaluación de la memoria social en estos animales mostró que tanto el grupo control como los APP-PS1 realizaron bien la discriminación entre el ratón novel y el objeto, sin embargo, los animales APP-PS1 sin tratamiento, no discriminaron correctamente en la evaluación social entre ambos ratones. De igual forma estos datos en relación con la sociabilidad contradicen los obtenidos en nuestro estudio, empleando ratones 3xTgAD y en estudios que utilizan el mismo modelo con la misma edad (Filali et al., 2011). En relación con el test de discriminación social los resultados obtenidos son congruentes con los obtenidos en nuestro modelo y en estudios que emplean este mismo modelo y que hemos referido anteriormente (Cheng et al., 2014; Filali et al., 2011).

Otro modelo animal en el que se ha empleado el paradigma de la memoria social es el ratón C57bl6 tratado farmacológicamente. El uso de la prueba de 3-chamber-room en ratones en los que, mediante optogenética, se activan o inhiben las proyecciones desde la BLA hasta el VHPC mostró

alteraciones en la prueba de socialización tras la activación de esta vía (Felix-Ortiz & Tye, 2014), resultados que son concordantes con los que nosotros hemos expuesto. En otro estudio, que emplea esta misma cepa de ratón, C57bl6, tratada con ketamina, para evaluar el papel de la amígdala en la esquizofrenia, la evaluación de la memoria social mostró significativas alteraciones en la sociabilidad por parte de los animales tratados (Mihara et al., 2017), lo cual refuerza los resultados obtenidos en nuestro estudio.

En resumen, se puede observar que existe una relación entre el déficit en el comportamiento social en este modelo animal 3xTg-AD en relación con la edad de evaluación. A edades tempranas hemos observado que las ratonas 3xTgAD ya presentan alteraciones en su capacidad de discriminación social a los 3 meses, y de sociabilidad a partir de los 6 meses. Por tal motivo se requiere futuras investigaciones sobre las alteraciones en la memoria social tanto en modelos animales como estudios en pacientes con la EA, que permitan dilucidar las áreas específicas a nivel de la amígdala que pudieran verse alteradas en la EA y abordar el estudio de las vías implicadas y afectadas en este proceso de reconocimiento social.

4.5. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN LA ACTIVIDAD NEURONAL EN AMÍGDALA.

En la EA, los déficits cognitivos presentes son el resultado de una alteración en la plasticidad sináptica y la memoria, el cual puede evaluarse mediante la reducción de proteínas sinápticas en áreas como el hipocampo y la amígdala (Hongpaisan et al., 2011). Secundario al estrés crónico, tanto el hipocampo como la BLA, muestran alteraciones en la plasticidad neuronal (Rei et al., 2015). La memoria emocional dependiente de la amígdala facilita la memoria espacial dependiente

del hipocampo, de manera que la amígdala modula los déficits de memoria del hipocampo inducidos por el estrés (Rei et al., 2015; Waddell et al., 2008). Muchos genes tempranos inmediatos (IEG) están relacionados con la plasticidad sináptica. El gen c-fos representa el primer IEG identificado (Greenberg & Ziff, 1984) y es indispensable para el mantenimiento de la plasticidad sináptica normal. Los ratones que carecen de c-Fos en el cerebro presentan deficiencias en el aprendizaje espacial y contextual, así como una disminución de la de la transmisión sináptica en las sinapsis entre CA3 y CA1 (Gass et al., 2004; Sheng & Greenberg, 1990). En este sentido, recientemente se ha demostrado que esta memoria emocional dependería de la amígdala y estaría sustentada en la regulación al alza de c-Fos (Peng et al., 2017). Por ello es sumamente interesante caracterizar el patrón de expresión de c-fos en la amígdala de ratonas 3xTgAD, ya que, como hemos demostrado anteriormente, presentan déficits de reconocimiento social.

Nuestros resultados demuestran una reducción significativa a los 9 meses en la actividad neuronal en áreas de ACO y MeA y en el área de la corteza piriforme a los 12 (PirII) y 15 meses (Pir III). , Estudios previos han examinado la contribución de estas áreas en el comportamiento social y memoria emocional específicamente en áreas de la amígdala (LeDoux et al., 2017; Tovote et al., 2015; Yao et al., 2013). Aunque la edad de los animales no es la misma, estos datos concuerdan con investigaciones previas que mostraron que una disminución en la transcripción de los genes de activación temprana como c-fos en la corteza e hipocampo en ratones 3xTg-AD de 24 meses de edad (Lambracht-Washington et al., 2021). Así mismo, el estudio realizado en ratones 3xTg-AD de 6 y 12 meses de edad , mediante inmunotransferencia mostró una disminución de c-fos en el hipocampo ventral de estos animales, en relación a los controles (Rodríguez-Ortiz et al., 2020). Como señalan estudios previos, en la EA se ve reducida la expresión de algunos genes, que impiden a futuro la terapia para tratar esta enfermedad (Sarkar et al., 2016). En este sentido,

aunque hemos encontrado una disminución en la señalización neuronal de c-fos en áreas de la amígdala y la corteza piriforme, regiones asociadas con el comportamiento social, en las ratonas 3xtg-AD, se requiere más investigaciones que permitan conocer con mayor detalle las vías implicadas que estarían afectadas.

4.6. LIMITACIONES DEL ESTUDIO

A pesar de las limitaciones que todo modelo animal presenta para el estudio de cualquier patología, podemos considerar que el modelo animal 3xTgAD es fiable y constituye una herramienta válida en el estudio de la patología y desarrollo de futuras dianas terapéuticas en la EA. Tanto los aspectos cognitivos como emocionales asociados a la edad desarrollados en este modelo, y validado con pruebas de comportamiento, contribuyen a la validez del mismo. Sin embargo, es precisamente la edad uno de los factores limitantes en este modelo de EA, ya que, asociado con la edad se agrava la patología y disminuye la supervivencia. De hecho, la tasa de letalidad aumentó entre los 9 y 15 meses de edad, lo que dificultó el conseguir la homogeneidad de los grupos, dilatando el comienzo de las pruebas de comportamiento. Por tal motivo, si en futuros estudios aumentamos la muestras podremos minimizar las pérdidas generadas por el aumento de la mortalidad.

De igual forma, la otra limitación fue el conseguir una colonia estable. Este hecho fue especialmente crítico en los primeros meses y cruces, debido a que la tasa de éxito y natalidad fueron muy bajas.

Por otro lado, la ausencia en el estudio de otros parámetros neuroquímicos impidió la interpretación de otros indicadores patológicos que podríamos observar en este modelo animal, trabajos en curso en nuestro laboratorio van dirigidos a responder estas preguntas neurobiológicas en este modelo animal. Estos experimentos fueron comenzados, pero por motivos de tiempo y por la alarma de Covid-19 a nivel internacional no se pudieron concluir para ser adjuntados al presente manuscrito.

5. CONCLUSIONES

1. Respecto a sus homologas controles, los animales 3xTgAD no mostraron rasgos significativos de ansiedad. En la prueba de laberinto elevado únicamente a la edad de 3 meses han mostrado desinhibición, y a medida que fueron avanzando en la edad esta conducta no se evidenció. En campo abierto no existieron diferencias aunque futuras investigaciones se precisan para determinar la idoneidad de esta prueba con el modelo 3xTgAD.
2. Las hembras 3xTgAD presentan déficits en la memoria de reconocimiento a corto-medio plazo que se evidencian a partir de los 9 meses de edad.
3. En etapas más avanzadas del desarrollo neuropatológico, a partir de los 6 meses de edad, las hembras 3xTgAD sufren alteraciones en la sociabilidad, siendo incapaces de discriminar entre el objeto y el coespecífico. Esta alteración podría correlacionar con el deterioro en el reconocimiento de objetos observado a partir de los 9 meses.
4. Desde los primeros estadios de la patología en nuestro modelo 3xTgAD, existe un déficit en el reconocimiento social y la memoria emocional que es incluso más evidente a partir de los 12 meses de edad.
5. Existe una disminución de la expresión del c-fos en áreas Pir, MeA, CxA y Aco. Esta disminución podría explicar los déficits observados tanto en el reconocimiento de objetos, como en sociabilidad y reconocimiento social observada en el modelo 3xTgAD.
6. El modelo animal 3xTgAD constituye una buena herramienta para el estudio de la neuropatología de la EA, pues presenta déficits cognitivos y emocionales que debutan en estadios temporales tempranos y constituye, por tanto, una estrategia útil para dilucidar las alteraciones relacionadas presentes tanto en la EOAD como en LOAD.

6. BIBLIOGRAFÍA

Adolphs, R. (2010). What does the amygdala contribute to social cognition? *Ann N Y Acad Sci*, 1191(1), 42–61. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05445.x>.What

Adolphs, R., Baron-Cohen, S., & Tranel, D. (2002). Impaired recognition of social emotions following amygdala damage. *Journal of Cognitive Neuroscience*, 14(8), 1264–1274. <https://doi.org/10.1162/089892902760807258>

Almaraz-Espinoza, A., & Grider, M. H. (2020). *Physiology, Long Term Memory*.

Amaral, D. G., Veazey, R. B., & Cowan, W. M. (1982). Some observations on hypothalamo-amygdaloid connections in the monkey. *Brain Research*, 252(1), 13–27. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(82\)90974-X](https://doi.org/10.1016/0006-8993(82)90974-X)

Amodio, D. M., & Frith, C. D. (2006). Meeting of minds: the medial frontal cortex and social cognition. *Nature Reviews Neuroscience*, 7(4), 268–277. <https://doi.org/10.1038/nrn1884>

Andrews, S. J., Fulton-Howard, B., & Goate, A. (2020). Interpretation of risk loci from genome-wide association studies of Alzheimer's disease. *The Lancet Neurology*, 19(4), 326–335. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(19\)30435-1](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(19)30435-1)

Antunes, M., & Biala, G. (2012). The novel object recognition memory: Neurobiology, test procedure, and its modifications. *Cognitive Processing*, 13(2), 93–110. <https://doi.org/10.1007/s10339-011-0430-z>

Arendt, T. (2009). Synaptic degeneration in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.*, 118(1), 167-79.

Arsenault, D., Julien, C., Tremblay, C., & Calon, F. (2011). DHA improves cognition and prevents dysfunction of entorhinal cortex neurons in 3xTg-AD mice. *PLoS ONE*, 6(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017397>

Atzil, S., Touroutoglou, A., Rudy, T., Salcedo, S., Feldman, R., Hooker, J. M., Dickerson, B. C., Catana, C., & Barrett, L. F. (2017). Dopamine in the medial amygdala network mediates human bonding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(9),

2361–2366. <https://doi.org/10.1073/pnas.1612233114>

Baddeley, A. D., Bressi, S., Della Sala, S., Logie, R., & Spinnler, H. (1991). The decline of working memory in alzheimer's disease: A longitudinal study. *Brain*. <https://doi.org/10.1093/brain/114.6.2521>

Balasa, M., Gelpi, E., Antonell, A., Rey, M. J., Sanchez-Valle, R., Molinuevo, J. L., & Llado, A. (2011). Clinical features and APOE genotype of pathologically proven early-onset Alzheimer disease. *Neurology*, *76*(20), 1720–1725. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e31821a44dd>

Ballatore, C., Lee, V. -Y., & Trojanowski, J.-Q. (2007). Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. *Nat Rev Neurosci*, *8*, 663–72.

Barrash, J., Tranel, D., & Anderson, S. W. (2000). Acquired Personality Disturbances Associated With Bilateral Damage to the Ventromedial Prefrontal Region. *Developmental Neuropsychology*, *18*(3), 355–381. <https://doi.org/10.1207/S1532694205Barrash>

Bateman, R. J., Aisen, P. S., De Strooper, B., Fox, N. C., Lemere, C. A., Ringman, J. M., Salloway, S., Sperling, R. A., Windisch, M., & Xiong, C. (2010). Autosomal-dominant Alzheimer's disease: a review and proposal for the prevention of Alzheimer's disease. *Alzheimer's Research & Therapy*, *3*(1), 1. <https://doi.org/10.1186/alzrt59>

Bauer, R. M., Grande, L., & Valenstein, E. (2003). *Amnesic Disorders*. En: K.M. Heilman y E. Valenstein (Eds.). *Clinical Neuropsychology* (New York: Oxford University Press. (ed.); 4th ed).

Baxter, M. G. (2010). "I've seen it all before" Explaining age-related impairments in object recognition. Theoretical comment on Burke et al. (2010). *Behavioral Neuroscience*, *124*(5), 706–709. <https://doi.org/10.1037/a0021029>

Becker, B., Mihov, Y., Scheele, D., Kendrick, K. M., Feinstein, J. S., Matusch, A., Aydin, M., Reich, H., Urbach, H., Oros-Peusquens, A. M., Shah, N. J., Kunz, W. S., Schlaepfer, T. E., Zilles, K., Maier, W., & Hurlemann, R. (2012). Fear processing and social networking in the absence of a functional amygdala. *Biological Psychiatry*, *72*(1), 70–77. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPSYCH.2011.11.024>

Belfiore, R., Rodin, A., Ferreira, E., Velazquez, R., Branca, C., Caccamo, A., & Oddo, S. (2019). Temporal and regional progression of Alzheimer's disease-like pathology in 3xTg-AD mice. *Aging Cell*, *18*(1). <https://doi.org/10.1111/ace1.12873>

Bergan, J. F., Ben-Shaul, Y., & Dulac, C. (2014). Sex-specific processing of social cues in the medial amygdala. *ELife*, *3*, 1–22. <https://doi.org/10.7554/elife.02743>

Bertram, L., McQueen, M. ., Mullin, K., Blacker, D., & R.E, T. (2007). Systematic meta-analyses of Alzheimer disease genetic association studies: the AlzGene database. *Nat Genet. Nat Genet*, *39*(1), 17–23.

Bertrand, J. M., Mazancieux, A., Moulin, C. J. A., B ejot, Y., Rouaud, O., & Souchay, C. (2019). In the here and now: Short term memory predictions are preserved in Alzheimer's disease. *Cortex*, *119*, 158–164. <https://doi.org/10.1016/j.cortex.2019.03.027>

Beyeler, A., Namburi, P., Glober, G. F., Simonnet, C., Calhoon, G. G., Conyers, G. F., Luck, R., Wildes, C. P., & Tye, K. M. (2016). Divergent Routing of Positive and Negative Information from the Amygdala during Memory Retrieval. *Neuron*, *90*(2), 348–361. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.03.004>

Bickart, K. C., Dickerson, B. C., & Feldman Barrett, L. (2014). The amygdala as a hub in brain networks that support social life. *Neuropsychologia*, *63*, 235–248. <https://doi.org/10.1016/j.neuropsychologia.2014.08.013>

Bickart, K. C., Hollenbeck, M. C., Barrett, L. F., & Dickerson, B. C. (2012). Intrinsic amygdala-cortical functional connectivity predicts social network size in humans. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *32*(42), 14729–14741. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1599-12.2012>

Bicks, L. K., Koike, H., Akbarian, S., & Morishita, H. (2015). Prefrontal Cortex and Social Cognition in Mouse and Man. *Frontiers in Psychology*, *6*(November), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2015.01805>

Billings, L. M., Oddo, S., Green, K. N., McGaugh, J. L., & LaFerla, F. M. (2005). Intraneuronal Abeta

causes the onset of early Alzheimer's disease-related cognitive deficits in transgenic mice. *Neuron*. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.01.040>

Braak, H., & Braak, E. (1991). Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathologica*, *82*(4), 239–259. <https://doi.org/10.1007/BF00308809>

Braak, H., & Braak, E. (1997). Frequency of stages of Alzheimer-related lesions in different age categories. *Neurobiology of Aging*, *18*(4), 351–357. [https://doi.org/10.1016/S0197-4580\(97\)00056-0](https://doi.org/10.1016/S0197-4580(97)00056-0)

Braak, Heiko, Alafuzoff, I., Arzberger, T., Kretschmar, H., & Tredici, K. (2006). Staging of Alzheimer disease-associated neurofibrillary pathology using paraffin sections and immunocytochemistry. *Acta Neuropathologica*. <https://doi.org/10.1007/s00401-006-0127-z>

Brothers, L. (1990). The social brain: a project for integrating primate behavior and neurophysiology in a new domain. *Concepts Neurosci*, *1*, 27–51.

Brown, R. E., Corey, S. C., & Moore, A. K. (1999). Differences in measures of exploration and fear in MHC-congenic C57BL/6J and B6-H-2K mice. *Behavior Genetics*, *29*(4), 263–271. <https://doi.org/10.1023/A:1021694307672>

Brueckner, K., & Moritz, S. (2009). Emotional valence and semantic relatedness differentially influence false recognition in mild cognitive impairment, Alzheimer's disease, and healthy elderly. *J Int Neuropsychol Soc*, *15*(2), 268–76.

Bucks, R. S., & Radford, S. A. (2004). Emotion processing in Alzheimer's disease. *Aging and Mental Health*, *8*(3), 222–232. <https://doi.org/10.1080/13607860410001669750>

Burnouf, S., Gorsky, M. K., Dols, J., Grönke, S., & Partridge, L. (2015). A β 43 is neurotoxic and primes aggregation of A β 40 in vivo. *Acta Neuropathologica*, *130*(1), 35–47. <https://doi.org/10.1007/s00401-015-1419-y>

Buzsáki, G. (1996). The hippocampo-neocortical dialogue. *Cereb Cortex*, *6*(2), 81–92.

Bzdok, D., Schilbach, L., Vogeley, K., Schneider, K., Laird, A. R., Langner, R., & Eickhoff, S. B.

(2012). Parsing the neural correlates of moral cognition: ALE meta-analysis on morality, theory of mind, and empathy. *Brain Structure & Function*, 217(4), 783–796. <https://doi.org/10.1007/s00429-012-0380-y>

Cádiz-Moretti, B., Otero-García, M., Martínez-García, F., & Lanuza, E. (2016). Afferent projections to the different medial amygdala subdivisions: a retrograde tracing study in the mouse. *Brain Structure and Function*, 221(2), 1033–1065. <https://doi.org/10.1007/s00429-014-0954-y>

Calderon-Garcidueñas, A. L., & Duyckaerts, C. (2017). Alzheimer disease. *Handbook of Clinical Neurology*, 145, 325–337. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802395-2.00023-7>

Canteras, N. S., Simerly, R. B., & Swanson, L. W. (1992). Connections of the posterior nucleus of the amygdala. *The Journal of Comparative Neurology*, 324(2), 143–179. <https://doi.org/10.1002/cne.903240203>

Canteras, N. S., Simerly, R. B., & Swanson, L. W. (1995). Organization of projections from the medial nucleus of the amygdala: A PHAL study in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 360(2), 213–245. <https://doi.org/10.1002/cne.903600203>

Carola, V., D'Olimpio, F., Brunamonti, E., Mangia, F., & Renzi, P. (2002). Evaluation of the elevated plus-maze and open-field tests for the assessment of anxiety-related behaviour in inbred mice. *Behavioural Brain Research*, 134(1–2), 49–57. [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(01\)00452-1](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(01)00452-1)

Cascella, M., & Al Khalili, Y. (2020). *Short Term Memory Impairment*.

Castellani, R. J., Rolston, R. K., & Smith, M. A. (2010). Alzheimer disease. *Disease-a-Month*, 56(9), 484–546. <https://doi.org/10.1016/j.disamonth.2010.06.001>

Chen, P. B., Hu, R. K., Wu, Y. E., Pan, L., Huang, S., Micevych, P. E., & Hong, W. (2019). Sexually Dimorphic Control of Parenting Behavior by the Medial Amygdala. *Cell*, 176(5), 1206–1221.e18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.01.024>

Cheng, D., Spiro, A. S., Jenner, A. M., Garner, B., & Karl, T. (2014). Long-Term Cannabidiol Treatment Prevents the Development of Social Recognition Memory Deficits in Alzheimer's Disease Transgenic Mice. *Journal of Alzheimer's Disease*, 42(4), 1383–1396. <https://doi.org/10.3233/JAD-140921>

Chevallier, C., Kohls, G., Troiani, V., Brodtkin, E. S., & Schultz, R. T. (2012). The social motivation theory of autism. *Trends in Cognitive Sciences*, 16(4), 231–239. <https://doi.org/10.1016/j.tics.2012.02.007>

Chiquita, S., Ribeiro, M., Castelhana, J., Oliveira, F., Sereno, J., Batista, M., Abrunhosa, A., Rodrigues-Neves, A. C., Carecho, R., Baptista, F., Gomes, C., Moreira, P. I., Ambrósio, A. F., & Castelo-Branco, M. (2019). A longitudinal multimodal in vivo molecular imaging study of the 3xTg-AD mouse model shows progressive early hippocampal and taurine loss. *Human Molecular Genetics*, 28(13), 2174–2188. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddz045>

Choleris, E. (2001). A detailed ethological analysis of the mouse open field test: effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 25(3), 235–260. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(01\)00011-2](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(01)00011-2)

Cholfin, J. A., & Rubenstein, J. L. R. (2007). Patterning of frontal cortex subdivisions by Fgf17. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(18), 7652–7657. <https://doi.org/10.1073/pnas.0702225104>

Cisternas, P., Zolezzi, J. M., Lindsay, C., Rivera, D. S., Martinez, A., Bozinovic, F., & Inestrosa, N. C. (2018). New Insights into the Spontaneous Human Alzheimer's Disease-Like Model Octodon degus: Unraveling Amyloid- β Peptide Aggregation and Age-Related Amyloid Pathology. *Journal of Alzheimer's Disease*, 66(3), 1145–1163. <https://doi.org/10.3233/JAD-180729>

Clark, J. K., Furgerson, M., Crystal, J. D., Fechheimer, M., Furukawa, R., & Wagner, J. J. (2015). Alterations in synaptic plasticity coincide with deficits in spatial working memory in presymptomatic 3xTg-AD mice. *Neurobiology of Learning and Memory*, 125(125), 152–162. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2015.09.003>

Clinton, L. K., Billings, L. M., Green, K. N., Caccamo, A., Ngo, J., Oddo, S., McGaugh, J. L., & LaFerla, F. M. (2007). Age-dependent sexual dimorphism in cognition and stress response in the 3xTg-AD mice. *Neurobiology of Disease*, *28*(1), 76–82. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2007.06.013>

Cohen, Sarah, & Stackman, R. (2015). Assessing Rodent Hippocampal Involvement in the Novel Object Recognition Task. A Review. *Physiology & Behavior*, *15*(105–117), 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.08.002>.Assessing

Corder, E. H., Saunders, A. M., Strittmatter, W. J., Schmechel, D. E., Gaskell, P. C., Small, G. W., Roses, A. D., Haines, J. L., Pericak-Vance, M. A., Strittmatter, W. J., Schmechel, D., Gaskell, P. C., Small, G. W., Roses, A. D., Haines, J. L., & M.A, P.-V. (1993). Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science*, *261*(5123), 921–923. <https://doi.org/10.1126/science.8346443>

Courtney, S. (2010). Short-Term Memory: Psychological and Neural Aspects. In *Encyclopedia of Behavioral Neuroscience*.

Cowan, N. (2009). What are the differences between long-term, short-term, and working memory? Nelson. *NIH Public Access*, *6123*(07), 323–338. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(07\)00020-9](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(07)00020-9).What

Crews, L., & Masliah, E. (2010). Molecular mechanisms of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Human Molecular Genetics*, *19*(R1), 12–20. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq160>

DiBenedictis, B. T., Ingraham, K. L., Baum, M. J., & Cherry, J. A. (2012). Disruption of urinary odor preference and lordosis behavior in female mice given lesions of the medial amygdala. *Physiology & Behavior*, *105*(2), 554–559. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2011.09.014>

Drummond, E., & Wisniewski, T. (2017). Alzheimer's disease: experimental models and reality. *Acta Neuropathologica*, *133*(2), 155–175. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1662-x>

DSM-III. (1980). *Diagnostic and statistical manual of mental disorders (3rd ed.)* (A. P. Association (ed.)).

DSM-IV. (1997). *Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales DSM-IV-TR* (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION (APA) (ed.)).

DSM-V. (2013). *Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales (5^a ed.)* (merican P. Publishing (ed.)).

Dubois, B., Feldman, H. H., Jacova, C., DeKosky, S. T., Barberger-Gateau, P., Cummings, J., Delacourte, A., Galasko, D., Gauthier, S., Jicha, G., Meguro, K., O'Brien, J., Pasquier, F., Robert, P., Rossor, M., Salloway, S., Stern, Y., Visser, P. J., & Scheltens, P. (2007a). Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: revising the NINCDS-ADRDA criteria. In *Lancet Neurology* (Vol. 6, Issue 8, pp. 734–746). [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(07\)70178-3](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(07)70178-3)

Dubois, B., Feldman, H. H., Jacova, C., DeKosky, S. T., Barberger-Gateau, P., Cummings, J., Delacourte, A., Galasko, D., Gauthier, S., Jicha, G., Meguro, K., O'Brien, J., Pasquier, F., Robert, P., Rossor, M., Salloway, S., Stern, Y., Visser, P. J., & Scheltens, P. (2007b). Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: revising the NINCDS-ADRDA criteria. *The Lancet Neurology*, 6(8), 734–746. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(07\)70178-3](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(07)70178-3)

Duyckaerts, C., Delatour, B., & Potier, M. C. (2009). Classification and basic pathology of Alzheimer disease. In *Acta Neuropathologica* (Vol. 118, Issue 1, pp. 5–36). <https://doi.org/10.1007/s00401-009-0532-1>

Elder, G., Gama Sosa, M., & De Gasperi, R. (2010). Transgenic Mouse Models of Alzheimer Disease. *Medicine*, 77, 69–81. <https://doi.org/10.1002/MSJ>

Emery, N. J., Capitanio, J. P., Mason, W. A., Machado, C. J., Mendoza, S. P., & Amaral, D. G. (2001). The effects of bilateral lesions of the amygdala on dyadic social interactions in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *Behavioral Neuroscience*, 115(3), 515–544. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11439444>

Ennaceur, A., & Delacour, J. (1988). A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behavioural Brain Research*, 31(1), 47–59. [https://doi.org/10.1016/0166-4328\(88\)90157-X](https://doi.org/10.1016/0166-4328(88)90157-X)

Erickson, K., Drevets, W., & Schulkin, J. (2003). Glucocorticoid regulation of diverse cognitive functions in normal and pathological emotional states. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 27(3), 233–246. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(03\)00033-2](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(03)00033-2)

Esquerda-Canals, G., Montoliu-Gaya, L., Güell-Bosch, J., & Villegas, S. (2017). Mouse Models of Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 57(4), 1171–1183. <https://doi.org/10.3233/JAD-170045>

Eysenck, M. W., Derakshan, N., Santos, R., & Calvo, M. G. (2007). Anxiety and cognitive performance: Attentional control theory. *Emotion*, 7(2), 336–353. <https://doi.org/10.1037/1528-3542.7.2.336>

Felix-Ortiz, A. C., & Tye, K. M. (2014). Amygdala inputs to the ventral hippocampus bidirectionally modulate social behavior. *Journal of Neuroscience*, 34(2), 586–595. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4257-13.2014>

Ferguson, J. N., Aldag, J. M., Insel, T. R., & Young, L. J. (2001). Oxytocin in the Medial Amygdala is Essential for Social Recognition in the Mouse. *Journal of Neuroscience*, 21(20), 8278–8285. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-20-08278.2001>

Ferretti, M. T., Iulita, M. F., Cavedo, E., Chiesa, P. A., Schumacher Dimech, A., Santuccione Chadha, A., Baracchi, F., Girouard, H., Misoch, S., Giacobini, E., Depypere, H., & Hampel, H. (2018). Sex differences in Alzheimer disease — the gateway to precision medicine. *Nature Reviews Neurology*, 14(8), 457–469. <https://doi.org/10.1038/s41582-018-0032-9>

Fiest, K. M., Roberts, J. I., Maxwell, C. J., Hogan, D. B., Smith, E. E., Frolkis, A., Cohen, A., Kirk, A., Pearson, D., Pringsheim, T., Venegas-Torres, A., & Jetté, N. (2016). The prevalence and incidence of dementia due to Alzheimer's disease: A systematic review and meta-analysis. In *Canadian Journal of Neurological Sciences*. <https://doi.org/10.1017/cjn.2016.36>

Filali, M., Lalonde, R., & Rivest, S. (2011). Anomalies in social behaviors and exploratory activities in an APPswe/PS1 mouse model of Alzheimer's disease. *Physiology and Behavior*, 104(5), 880–885. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2011.05.023>

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). *Behav Brain Res*, 234(2), 334–342. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.07.004>

Frandemiche, M. L., De Seranno, S., Rush, T., Borel, E., Elie, A., Arnal, I., Lante, F., & Buisson, A. (2014). Activity-Dependent Tau Protein Translocation to Excitatory Synapse Is Disrupted by Exposure to Amyloid-Beta Oligomers. *Journal of Neuroscience*, 34(17), 6084–6097. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4261-13.2014>

Frith, C. D., & Frith, U. (2008). Implicit and Explicit Processes in Social Cognition. *Neuron*, 60(3), 503–510. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.10.032>

Galea, E., Launay, N., Portero-Otin, M., Ruiz, M., Pamplona, R., Aubourg, P., Ferrer, I., & Pujol, A. (2012). Oxidative stress underlying axonal degeneration in adrenoleukodystrophy: A paradigm for multifactorial neurodegenerative diseases? *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1822(9), 1475–1488. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2012.02.005>

Galton, C. J., Patterson, K., Xuereb, J. H., & Hodges, J. R. (2000). Atypical and typical presentations of Alzheimer's disease: A clinical, neuropsychological, neuroimaging and pathological study of 13 cases. *Brain*. <https://doi.org/10.1093/brain/123.3.484>

Games, D., Adams, D., Alessandrini, R., Barbour, R., Borthellette, P., Blackwell, C., Carr, T., Clemens, J., Donaldson, T., Gillespie, F., Guido, T., Hagopian, S., Johnson-Wood, K., Khan, K., Lee, M., Liebowitz, P., Lieberburg, I., Little, S., Masliah, E., ... Zhao, J. (1995). Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F β -amyloid precursor protein. In *Nature* (Vol. 373, Issue 6514, pp. 523–527). <https://doi.org/10.1038/373523a0>

Gao, X.-M. M., Elmer, G. I., Adams-Huet, B., & Tamminga, C. A. (2009). Social memory in mice: Disruption with an NMDA antagonist and attenuation with antipsychotic drugs. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 92(2), 236–242. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2008.11.016>

García-Díaz, C., Sánchez-Catalán, M. J., Castro-Salazar, E., García-Avilés, A., Albert-Gascó, H.,

Sánchez-Sarasúa de la Bárcena, S., Sánchez-Pérez, A. M., Gundlach, A. L., & Olucha-Bordonau, F. E. (2019). Nucleus incertus ablation disrupted conspecific recognition and modified immediate early gene expression patterns in 'social brain' circuits of rats. *Behavioural Brain Research*, 356(332–347), 332–347. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2018.08.035>

Gass, P., Fleischmann, A., Hvalby, O., Jensen, V., Zacher, C., Strekalova, T., Kvello, A., Wagner, E. F., & Sprengel, R. (2004). Mice with a fra-1 knock-in into the c-fos locus show impaired spatial but regular contextual learning and normal LTP. *Molecular Brain Research*, 130(1–2), 16–22. <https://doi.org/10.1016/j.molbrainres.2004.07.004>

Gendreau, L., & Hall, G. . (2013). Tangles, Toxicity, and Tau Secretion in AD - New Approaches to a Vexing Problem. *Front Neurol*, 160(4).

Giménez-Llort, L., Blázquez, G., Cañete, T., Johansson, B., Oddo, S., Tobeña, A., LaFerla, F. M., & Fernández-Teruel, A. (2007). Modeling behavioral and neuronal symptoms of Alzheimer's disease in mice: A role for intraneuronal amyloid. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 31(1), 125–147. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2006.07.007>

Gowrishankar, S., Yuan, P., Wu, Y., Schrag, M., Paradise, S., Grutzendler, J., De Camilli, P., & Ferguson, S. M. (2015). Massive accumulation of luminal protease-deficient axonal lysosomes at Alzheimer's disease amyloid plaques. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(28), E3699–E3708. <https://doi.org/10.1073/pnas.1510329112>

Greenberg, M. E., & Ziff, E. B. (1984). Stimulation of 3T3 cells induces transcription of the c-fos proto-oncogene. *Nature*, 311(5985), 433–438. <https://doi.org/10.1038/311433a0>

Grignon, Y., Duyckaerts, C., Bennefib, M., & Hauw, J. J. (1998). Cytoarchitectonic alterations in the supramarginal gyrus of late onset Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica*. <https://doi.org/10.1007/s004010050816>

Gu, G., Cornea, A., & Simerly, R. B. (2003). Sexual differentiation of projections from the principal nucleus of the bed nuclei of the stria terminalis. *The Journal of Comparative Neurology*, 460(4), 542–562. <https://doi.org/10.1002/cne.10677>

Guo, J. L., & Lee, V. M. Y. (2014). Cell-to-cell transmission of pathogenic proteins in neurodegenerative diseases. *Nature Medicine*, *20*(2), 130–138. <https://doi.org/10.1038/nm.3457>

Gur, R., Tendler, A., & Wagner, S. (2014). Long-Term Social Recognition Memory Is Mediated by Oxytocin-Dependent Synaptic Plasticity in the Medial Amygdala. *Biological Psychiatry*, *76*(5), 377–386. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2014.03.022>

Haass, C., Kaether, C., Thinakaran, G., & Sisodia, S. (2012). Trafficking and proteolytic processing of APP. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006270>

Halagappa, V. K. M., Guo, Z., Pearson, M., Matsuoka, Y., Cutler, R. G., LaFerla, F. M., & Mattson, M. P. (2007). Intermittent fasting and caloric restriction ameliorate age-related behavioral deficits in the triple-transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Disease*, *26*(1), 212–220. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2006.12.019>

Hall, C. S. (1934). Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. *Journal of Comparative Psychology*, *18*(3), 385–403. <https://doi.org/10.1037/h0071444>

Heppner, F. L., Ransohoff, R. M., & Becher, B. (2015). Immune attack: the role of inflammation in Alzheimer disease. *Nature Reviews Neuroscience*, *16*(6), 358–372. <https://doi.org/10.1038/nrn3880>

Hitti, F. L., & Siegelbaum, S. A. (2014). The hippocampal CA2 region is essential for social memory. *Nature*, *508*(7494), 88–92. <https://doi.org/10.1038/nature13028>

Hofmann, H. A., Beery, A. K., Blumstein, D. T., Couzin, I. D., Earley, R. L., Hayes, L. D., Hurd, P. L., Lacey, E. A., Phelps, S. M., Solomon, N. G., Taborsky, M., Young, L. J., & Rubenstein, D. R. (2014). An evolutionary framework for studying mechanisms of social behavior. *Trends in Ecology & Evolution*, *29*(10), 581–589. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2014.07.008>

Hong, W., Kim, D.-W. W., & Anderson, D. J. (2014). Antagonistic control of social versus repetitive self-grooming behaviors by separable amygdala neuronal subsets. *Cell*, *158*(6), 1348–1361. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.07.049>

Hongpaisan, J., Sun, M. K., & Alkon, D. L. (2011). PKC ϵ activation prevents synaptic loss, A β elevation, and cognitive deficits in alzheimer's disease transgenic mice. *Journal of Neuroscience*, *31*(2), 630–643. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5209-10.2011>

Huang, T.-N., Hsu, T.-T., Lin, M.-H., Chuang, H.-C., Hu, H.-T., Sun, C.-P., Tao, M.-H., Lin, J. Y., & Hsueh, Y.-P. (2019). Interhemispheric Connectivity Potentiates the Basolateral Amygdalae and Regulates Social Interaction and Memory. *Cell Reports*, *29*(1), 34-48.e4. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.08.082>

Huang, W.-C., Zucca, A., Levy, J., & Page, D. T. (2020). Social Behavior Is Modulated by Valence-Encoding mPFC-Amygdala Sub-circuitry. *Cell Reports*, *32*(2), 107899. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.107899>

Hyman, B. T., Van Hoesen, G. W., Damasio, A. R., & Barnes, C. L. (1984). Alzheimer's disease: cell-specific pathology isolates the hippocampal formation. *Science*, *225*(4667), 1168–1170.

Ishii, K. K., Osakada, T., Mori, H., Miyasaka, N., Yoshihara, Y., Miyamichi, K., & Touhara, K. (2017). A Labeled-Line Neural Circuit for Pheromone-Mediated Sexual Behaviors in Mice. *Neuron*, *95*(1), 123-137.e8. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.05.038>

Isogai, Y., Wu, Z., Love, M. I., Ahn, M. H.-Y., Bambah-Mukku, D., Hua, V., Farrell, K., & Dulac, C. (2018). Multisensory Logic of Infant-Directed Aggression by Males. *Cell*, *175*(7), 1827-1841.e17. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.11.032>

Jack, C. R., Bennett, D. A., Blennow, K., Carrillo, M. C., Dunn, B., Haeberlein, S. B., Holtzman, D. M., Jagust, W., Jessen, F., Karlawish, J., Liu, E., Molinuevo, J. L., Montine, T., Phelps, C., Rankin, K. P., Rowe, C. C., Scheltens, P., Siemers, E., Snyder, H. M., ... Silverberg, N. (2018). NIA-AA Research Framework: Toward a biological definition of Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia*, *14*(4), 535–562. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2018.02.018>

Jahn, R. G. (2019). Introduction. *The Role of Consciousness in the Physical World*, 1–5. <https://doi.org/10.4324/9780429314384-1>

Janak, P. H., & Tye, K. M. (2015). From circuits to behaviour in the amygdala. *Nature*, *517*(7534),

284–292. <https://doi.org/10.1038/nature14188>

Janelins, M. C., Mastrangelo, M. A., Oddo, S., LaFerla, F. M., Federoff, H. J., & Bowers, W. J. (2005). Early correlation of microglial activation with enhanced tumor necrosis factor- α and monocyte chemoattractant protein-1 expression specifically within the entorhinal cortex of triple transgenic Alzheimer's disease mice. *Journal of Neuroinflammation*, *2*, 1–12. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-2-23>

Johansson, M., Stomrud, E., Lindberg, O., Westman, E., Johansson, P. M., van Westen, D., Mattsson, N., & Hansson, O. (2020). Apathy and anxiety are early markers of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, *85*, 74–82. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2019.10.008>

Jolicoeur, P., Lefebvre, C., & Martinez-Trujillo, J. (2015). *Mechanisms of Sensory Working Memory* (P. S. Elsevier (ed.); Vol. 21).

Kaidanovich-Beilin, O., Lipina, T., Vukobradovic, I., Roder, J., & Woodgett, J. R. (2010). Assessment of social interaction behaviors. *Journal of Visualized Experiments*, *0*(48), 1–6. <https://doi.org/10.3791/2473>

Katayama, T., Jodo, E., Suzuki, Y., Hoshino, K.-Y., Takeuchi, S., & Kayama, Y. (2009). Phencyclidine affects firing activity of basolateral amygdala neurons related to social behavior in rats. *Neuroscience*, *159*(1), 335–343. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.01.002>

Keshavarzi, S., Power, J. M., Albers, E. H. H., Sullivan, R. K. S., & Sah, P. (2015). Dendritic Organization of Olfactory Inputs to Medial Amygdala Neurons. *Journal of Neuroscience*, *35*(38), 13020–13028. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0627-15.2015>

Keshavarzi, S., Sullivan, R. K. P., Ianno, D. J., & Sah, P. (2014). Functional Properties and Projections of Neurons in the Medial Amygdala. *Journal of Neuroscience*, *34*(26), 8699–8715. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1176-14.2014>

Kidd, M. (1963). Paired helical filaments in electron microscopy of Alzheimer's disease. *Nature*, *12*(197), 192–193.

Killgore, W. D. S., & Yurgelun-Todd, D. A. (2005). Social anxiety predicts amygdala activation in adolescents viewing fearful faces. *NeuroReport*, *16*(15), 1671–1675. <https://doi.org/10.1097/01.wnr.0000180143.99267.bd>

Kirk, M., & Bertntsen, D. (2018). The life span distribution of autobiographical memory in Alzheimer's disease. *Neurology*, *32*(8), 906–919.

Kitamura, T. (2017). Driving and regulating temporal association learning coordinated by entorhinal-hippocampal network. *Neuroscience Research*, *121*, 1–6.

Knierim, J. J. (2015). The hippocampus . *Current Biology*, *25*, 1107–1125,.

Knierim, J. J., & Neunuebel, J. P. (2016). Tracking the flow of hippocampal computation: Pattern separation, pattern completion, and attractor dynamics. *Neurobiology of Learning and Memory*, *129*, 38–49. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2015.10.008>

Kobylecki, C., Haense, C., Harris, J. M., Stopford, C. L., Segobin, S. H., Jones, M., Richardson, A. M. T., Gerhard, A., Anton-Rodriguez, J., Thompson, J. C., Herholz, K., & Snowden, J. S. (2018). Functional neuroanatomical associations of working memory in early-onset Alzheimer's disease. *International Journal of Geriatric Psychiatry*, *33*(1), 176–184. <https://doi.org/10.1002/gps.4703>

Kogan, J. H., Franklandand, P. W., & Silva, A. J. (2000). Long-term memory underlying hippocampus-dependent social recognition in mice. *Hippocampus*, *10*(1), 47–56. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1063\(2000\)10:1<47::AID-HIPO5>3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1063(2000)10:1<47::AID-HIPO5>3.0.CO;2-6)

Kohler, C. G., Anselmo-Gallagher, G., Bilker, W., Karlawish, J., Gur, R. E., & Clark, C. M. (2005). Emotion-Discrimination Deficits in Mild Alzheimer Disease. *The American Journal of Geriatric Psychiatry*, *13*(11), 926–933. <https://doi.org/10.1097/00019442-200511000-00002>

Kondo, Y. (1992). Lesions of the medial amygdala produce severe impairment of copulatory behavior in sexually inexperienced male rats. *Physiology & Behavior*, *51*(5), 939–943. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(92\)90074-C](https://doi.org/10.1016/0031-9384(92)90074-C)

Kosik K.S. (1993). The molecular and cellular biology of tau. *Brain Pathol.*, *3*(1), 39-43.

Kraepelin, E. (1910). *Psychiatrie: Ein Lehrbuch für Studierende und Ärzte*. (Leipzig: Barth; (ed.)). Leipzig: J. A. Barth, 1910-1913.

Krajchich, I., Adolphs, R., Tranel, D., Denburg, N. L., & Camerer, C. F. (2009). Economic Games Quantify Diminished Sense of Guilt in Patients with Damage to the Prefrontal Cortex. *Journal of Neuroscience*, *29*(7), 2188–2192. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5086-08.2009>

Kwak, S., Joo, W. T., Youm, Y., & Chey, J. (2018). Social brain volume is associated with in-degree social network size among older adults. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *285*(1871). <https://doi.org/10.1098/rspb.2017.2708>

Lai, W.-S. (2005). Recognition of Familiar Individuals in Golden Hamsters: A New Method and Functional Neuroanatomy. *Journal of Neuroscience*, *25*(49), 11239–11247. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2124-05.2005>

Lambracht-Washington, Fu, M., Linda, H., & Rosenbert, R. (2021). Changes in the brain transcriptome after DNA A β 42 trimer immunization in a 3xTg-AD mouse model. *Neurobiol Dis.*, *148*, 1–35. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2020.105221.Changes>

LeDoux, J. (1993). Emotional memory systems in the brain. Behavioural brain research. *Behavioural Brain Research*, *58*(1–2), 69–79.

LeDoux, Moscarello, Sears, R., & Campese, V. (2017). The birth, death and resurrection of avoidance: A reconceptualization of a troubled paradigm. *Molecular Psychiatry*, *22*(1), 24–36. <https://doi.org/10.1038/mp.2016.166>

Leighty, R. E., Nilsson, L. N. G., Potter, H., Costa, D. A., Low, M. A., Bales, K. R., Paul, S. M., & Arendash, G. W. (2004). Use of multivariate statistical analysis to characterize and discriminate between the performance of four Alzheimer's transgenic mouse lines differing in A β deposition. *Behavioural Brain Research*, *153*(1), 107–121. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2003.11.004>

Li, Y., Mathis, A., Grewe, B. F., Osterhout, J. A., Ahanonu, B., Schnitzer, M. J., Murthy, V. N., & Dulac, C. (2017). Neuronal Representation of Social Information in the Medial Amygdala of Awake Behaving Mice. *Cell*, *171*(5), 1176-1190.e17. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.10.015>

Liang, Y., Pertzov, Y., Nicholas, J. M., Henley, S. M. D., Crutch, S., Woodward, F., Leung, K., Fox, N. C., & Husain, M. (2016). Visual short-term memory binding deficit in familial Alzheimer's disease. *Cortex*, *78*, 150–164. <https://doi.org/10.1016/j.cortex.2016.01.015>

Lymer, J. M., Sheppard, P. A. S., Kuun, T., Blackman, A., Jani, N., Mahbub, S., & Choleris, E. (2018). Estrogens and their receptors in the medial amygdala rapidly facilitate social recognition in female mice. *Psychoneuroendocrinology*, *89*(December 2017), 30–38. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2017.12.021>

MacLean, P. D. (1952). Some psychiatric implications of physiological studies on frontotemporal portion of limbic system (Visceral brain). *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*, *4*(4), 407–418. [https://doi.org/10.1016/0013-4694\(52\)90073-4](https://doi.org/10.1016/0013-4694(52)90073-4)

Mandelkow, E. M., Biernat, J., Drewes, G., Gustke, N., Trinczek, B., & Mandelkow, E. (1995). Tau domains, phosphorylation, and interactions with microtubules. *Neurobiology of Aging*, *16*(3), 355–362. [https://doi.org/10.1016/0197-4580\(95\)00025-A](https://doi.org/10.1016/0197-4580(95)00025-A)

Masters, C. L., Bateman, R. J., Blennow, K., Rowe Christopher, Sperling, R. A., & Cummings, J. (2015). *Alzheimer's disease*. *15*(1).

Masters, C. L., & Selkoe, D. J. (2012). Biochemistry of amyloid β -protein and amyloid deposits in Alzheimer disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *2*(6), 1–24. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006262>

Mastrangelo, M. A., & Bowers, W. J. (2008). Detailed immunohistochemical characterization of temporal and spatial progression of Alzheimer's disease-related pathologies in male triple-transgenic mice. *BMC Neurosci*, *9*, 81. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-9-81>

Matthews, B. R. (2015). Memory Dysfunction. *CONTINUUM: Lifelong Learning in Neurology*, *21*, 613–626. <https://doi.org/10.1212/01.CON.0000466656.59413.29>

McDonald, A.J., & Mascagni, F. (1997). Projections of the lateral entorhinal cortex to the amygdala: a Phaseolus vulgaris leucoagglutinin study in the rat. *Neuroscience*, *77*(2), 445–459. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(96\)00478-2](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(96)00478-2)

McDonald, Alexander J. (1998). Cortical pathways to the mammalian amygdala. *Progress in Neurobiology*, 55(3), 257–332. [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(98\)00003-3](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(98)00003-3)

Meléndez, J. C., Escudero, J., Satorres, E., & Pitarque, A. (2019). Type of memory and emotional valence in healthy aging, mild cognitive impairment, and Alzheimer's disease. *Psicothema*, 31(1), 60–65. <https://doi.org/10.7334/psicothema2018.181>

Meunier, M., Bachevalier, J., Murray, E. A., Málková, L., & Mishkin, M. (1999). Effects of aspiration versus neurotoxic lesions of the amygdala on emotional responses in monkeys. *The European Journal of Neuroscience*, 11(12), 4403–4418. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.1999.00854.x>

Michael-Titus, A., Revest, P., & Shortland, P. (2010). The Nervous System. In *Segunda Edición*. Elsevier.

Mihara, T., Mensah-Brown, K., Sobota, R., Lin, R., Featherstone, R., & Siegel, S. J. (2017). Amygdala activity associated with social choice in mice. *Behavioural Brain Research*, 332, 84–89. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.04.040>

Miller, E. (1971). On the nature of the memory disorder in presenile dementia. *Neuropsychologia*, 9(1), 75–81.

Miller, E. (1973). Short- and long-term memory in patients with presenile dementia (Alzheimer's disease). *Cambridge University Press*; 3(2), 221–224.

Miller, E. K., Lundqvist, M., & Bastos, A. M. (2018). Working Memory 2.0. *Neuron*, 100(2), 463–475. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.09.023>

Miller, S. M., Marcotulli, D., Shen, A., & Zweifel, L. S. (2019). Divergent medial amygdala projections regulate approach-avoidance conflict behavior. *Nature Neuroscience*, 22(4), 565–575. <https://doi.org/10.1038/s41593-019-0337-z>

Mitchell, J. P. (2009). Inferences about mental states. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364(1521), 1309–1316. <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0318>

Mochizuki-Kawai, H. (2008). Neural basis of procedural memory. *Brain Nerve*, 60(7), 825–832.

Mohedano-Moriano, A., Pro-Sistiaga, P., Úbeda-Bañón, I., Crespo, C., Insausti, R., & Martínez-Marcos, A. (2007). Segregated pathways to the vomeronasal amygdala: differential projections from the anterior and posterior divisions of the accessory olfactory bulb. *European Journal of Neuroscience*, 25(7), 2065–2080. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05472.x>

Morgano, I. (2005). *Psicobiología del aprendizaje y la memoria: fundamentos y avances recientes*. *Revista de Neurología*, 40, 289–297.

Moy, S. S., Nadler, J. J., Perez, A., Barbaro, R. P., Johns, J. M., Magnuson, T. R., Piven, J., & Crawley, J. N. (2004). Sociability and preference for social novelty in five inbred strains: an approach to assess autistic-like behavior in mice. *Genes, Brain and Behavior*, 3(5), 287–302. <https://doi.org/10.1111/j.1601-1848.2004.00076.x>

Müller, C. U., Deller, T., & Korte, M. (2017). Not just amyloid: physiological functions of the amyloid precursor protein family. *Nat Rev Neurosci*, 18(5), 281–298.

Nadler, J. J., Moy, S. S., Dold, G., Simmons, N., Perez, A., Young, N. B., Barbaro, R. P., Piven, J., Magnuson, T. R., & Crawley, J. N. (2004). Automated apparatus for quantitation of social approach behaviors in mice. *Genes, Brain and Behavior*, 3(5), 303–314. <https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2004.00071.x>

Namburi, P., Beyeler, A., Yorozu, S., Calhoon, G. G., Halbert, S. A., Wichmann, R., Holden, S. S., Mertens, K. L., Anahtar, M., Felix-Ortiz, A. C., Wickersham, I. R., Gray, J. M., & Tye, K. M. (2015). A circuit mechanism for differentiating positive and negative associations. *Nature*, 520(7549), 675–678. <https://doi.org/10.1038/nature14366>

Nguyen, E. T., Selmanovic, D., Maltry, M., Morano, R., Franco-Villanueva, A., Estrada, C. M., & Solomon, M. B. (2020). Endocrine stress responsivity and social memory in 3xTg-AD female and male mice: A tale of two experiments. *Hormones and Behavior*, 126(August), 104852. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2020.104852>

Niu, H., Álvarez-Álvarez, I., Guillén-Grima, F., & Aguinaga-Ontoso, I. (2017). Prevalencia e incidencia de la enfermedad de Alzheimer en Europa: metaanálisis. *Neurología*, 32(8), 523–532.

<https://doi.org/10.1016/j.nrl.2016.02.016>

Noack, J., Murau, R., & Engelmann, M. (2015). Consequences of temporary inhibition of the medial amygdala on social recognition memory performance in mice. *Frontiers in Neuroscience*, 9. <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00152>

Noack, J., Richter, K., Laube, G., Haghgoo, H. A., Veh, R. W., & Engelmann, M. (2010). Different importance of the volatile and non-volatile fractions of an olfactory signature for individual social recognition in rats versus mice and short-term versus long-term memory. *Neurobiology of Learning and Memory*, 94(4), 568–575. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2010.09.013>

Nunez, J. (2008). Morris Water Maze Experiment. *J Vis Exp*, 897.

Oddo, S., Caccamo, A., Kitazawa, M., Tseng, B. P., & LaFerla, F. M. (2003). Amyloid deposition precedes tangle formation in a triple transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 24(8), 1063–1070. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2003.08.012>

Oddo, S., Caccamo, A., Shepherd, J. D., Murphy, M. P., Golde, T. E., Kaye, R., Metherate, R., Mattson, M. P., Akbari, Y., & LaFerla, F. M. (2003). Triple-transgenic model of Alzheimer's Disease with plaques and tangles: Intracellular A β and synaptic dysfunction. *Neuron*, 39(3), 409–421. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00434-3](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00434-3)

Okuyama, T. (2018). Social memory engram in the hippocampus. *Neuroscience Research*, 129, 17–23. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2017.05.007>

OMS. (1992). *Organización Mundial de la Salud. Clasificación Internacional de Enfermedades, décima edición (CIE- 10)*. (W. H. Organization (ed.)). World Health Organization.

Pairojana, T., Phasuk, S., Suresh, P., Huang, S.-P., Pakaprot, N., Chompoopong, S., Hsieh, T.-C., & Liu, I. Y. (2021). Age and gender differences for the behavioral phenotypes of 3xTg alzheimer's disease mice. *Brain Research*, 1762(December 2020), 147437. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2021.147437>

Parra, M. A., Abrahams, S., Fabi, K., Logie, R., Luzzi, S., & Sala, S. Della. (2009). Short-term

memory binding deficits in Alzheimers disease. *Brain*, 132(4), 1057–1066.
<https://doi.org/10.1093/brain/awp036>

Parra, M. A., Abrahams, S., Logie, R. H., Méndez, L. G., Lopera, F., & Della Sala, S. (2010). Visual short-term memory binding deficits in familial Alzheimer's disease. *Brain*, 133(9), 2702–2713.
<https://doi.org/10.1093/brain/awq148>

Parra, M. A., Saarimäki, H., Bastin, M. E., Londoño, A. C., Pettit, L., Lopera, F., Della Sala, S., & Abrahams, S. (2015). Memory binding and white matter integrity in familial Alzheimer's disease. *Brain*, 138(5), 1355–1369. <https://doi.org/10.1093/brain/awv048>

Paxinos, G., & Franklin, K. B. J. (2012). *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates: Vol. 4th editio*. Academic Press.

Peng, C., Hong, X., Chen, W., Zhang, H., Tan, L., Wang, X., Ding, Y., & He, J. (2017). Melatonin ameliorates amygdala-dependent emotional memory deficits in Tg2576 mice by up-regulating the CREB/c-Fos pathway. *Neuroscience Letters*, 638, 76–82.
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2016.11.066>

Pericak-Vance, M. A., Bebout, J. L., Gaskell, P. C., Yamaoka, L. H., Hung, W. Y., Alberts, M. J., Walker, A. P., Bartlett, R. J., Haynes, C. A., Welsh, K. A., Earl, N. L., Heyman, A., Clark, C. M., & Roses, A. D. (1991). Linkage studies in familial Alzheimer disease: Evidence for chromosome 19 linkage. *American Journal of Human Genetics*, 48(6), 1034–1050.

Perna, C. J., & Engelman, M. (2016). Recognizing Others: Rodent's Social Memories. *Recognizing Others: Rodent's Social Memories*, 30, 25–45.

Petrovic, M., Hurt, C., Collins, D., Burns, A., Camus, V., Liperoti, R., A, M., Nobili, F., Robert, P., Tsolaki, M., Vellas, B., & Verhey F, B. E. (2007). ByrneClustering of behavioural and psychological symptoms in dementia (BPSD): a European Alzheimer's disease consortium (EADC) study. *Acta Clin Belg*, 62(6), 426–432.

Petrulis, A. (2020). *Structure and function of the medial amygdala* (pp. 39–61). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815134-1.00002-7>

Pietropaolo, S., Sun, Y., Li, R., Brana, C., Feldon, J., & Yee, B. K. (2009). Limited Impact of Social Isolation on Alzheimer-Like Symptoms in a Triple Transgenic Mouse Model. *Behavioral Neuroscience*. <https://doi.org/10.1037/a0013607>

Podhorna, J., & Brown, R. E. (2002). Strain differences in activity and emotionality do not account for differences in learning and memory performance between C57BL/6 and DBA/2 mice. *Genes, Brain and Behavior*, *1*(2), 96–110. <http://doi.wiley.com/10.1034/j.1601-183X.2002.10205.x>

Poldrack, R. A., & Gabrieli, J. D. E. (1997). Functional Anatomy of Long-Term Memory. *Journal of Clinical Neurophysiology*, *14*(4), 294–310.

Poppe, L., Rué, L., Timmers, M., Lenaerts, A., Storm, A., Callaerts-Vegh, Z., Courtand, G., De Boer, A., Smolders, S., Van Damme, P., Van Den Bosch, L., D'Hooge, R., De Strooper, B., Robberecht, W., & Lemmens, R. (2019). EphA4 loss improves social memory performance and alters dendritic spine morphology without changes in amyloid pathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *Alzheimer's Research and Therapy*, *11*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13195-019-0554-4>

Preston, A. ., & Eichenbaum, H. (2013). Interplay of hippocampus and prefrontal cortex in memory. *Curr Biol*, *23*(17), 764–773.

Price, D. L., Martin, L. J., Powers, R. E., & Dellovade, T. L. (1991). The bed nucleus-amygdala continuum in human and monkey. *The Journal of Comparative Neurology*, *309*(4), 445–485. <https://doi.org/10.1002/cne.903090404>

Price, J. L., Ko, A. I., Wade, M. J., Tsou, S. K., McKeel, D. W., & Morris, J. C. (2001). Neuron number in the entorhinal cortex and CA1 in preclinical alzheimer disease. *Archives of Neurology*, *58*(9), 1395–1402. <https://doi.org/10.1001/archneur.58.9.1395>

Prince, M., Bryce, R., Albanese, E., Wimo, A., Ribeiro, W., & Ferri, C. P. (2015). The global prevalence of dementia: A systematic review and metaanalysis. *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association*, *9*(1), 63–75.e2. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2012.11.007>

Prince, M., Comas-Herrera, A., Knapp, M., & Karagiannidou, M. (2016). *World Alzheimer Report 2016.. Improving healthcare for people living with dementia*.

Pro-Sistiaga, P., Mohedano-Moriano, A., Ubeda-Bañon, I., Arroyo-Jimenez, M. del M., Marcos, P., Artacho-Pérula, E., Crespo, C., Insausti, R., Martinez-Marcos, A., Del Mar Arroyo-Jimenez, M., Marcos, P., Artacho-Pérula, E., Crespo, C., Insausti, R., Martinez-Marcos, A., Arroyo-Jimenez, M. del M., Marcos, P., Artacho-Pérula, E., Crespo, C., ... Martinez-Marcos, A. (2007). Convergence of olfactory and vomeronasal projections in the rat basal telencephalon. *The Journal of Comparative Neurology*, *504*(4), 346–362. <https://doi.org/10.1002/cne.21455>

Psotta, L., Rockahr, C., Gruss, M., Kirches, E., Braun, K., Lessmann, V., Bock, J., & Endres, T. (2015). Impact of an additional chronic BDNF reduction on learning performance in an Alzheimer mouse model. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *9*(March), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2015.00058>

Pudelewicz, A., Talarska, D., & Bączyk, G. (2019). Burden of caregivers of patients with Alzheimer's disease. *Scandinavian Journal of Caring Sciences*, *33*(2), 336–341. <https://doi.org/10.1111/scs.12626>

Raam, T., & Hong, W. (2021). Organization of neural circuits underlying social behavior: A consideration of the medial amygdala. *Current Opinion in Neurobiology*, *68*, 124–136. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2021.02.008>

Rademacher, L., Krach, S., Kohls, G., Irmak, A., Gründer, G., & Spreckelmeyer, K. N. (2010). Dissociation of neural networks for anticipation and consumption of monetary and social rewards. *NeuroImage*, *49*(4), 3276–3285. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2009.10.089>

Rei, D., Mason, X., Seo, J., Gräff, J., Rudenko, A., Wang, J., Rueda, R., Siegert, S., Cho, S., Canter, R. G., Mungenast, A. E., Deisseroth, K., & Tsai, L. H. (2015). Basolateral amygdala bidirectionally modulates stress-induced hippocampal learning and memory deficits through a p25/Cdk5-dependent pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *112*(23), 7291–7296. <https://doi.org/10.1073/pnas.1415845112>

Reitz, C., & Mayeux, R. (2014). Alzheimer disease: epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers. *Biochemical Pharmacology*, *88*(4), 640–651. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.12.024>

Riedel, B. C., Thompson, P. M., & Brinton, R. D. (2016). Age, APOE and sex: Triad of risk of Alzheimer's disease. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, *160*, 134–147. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2016.03.012>

Rilling, J. K., Glenn, A. L., Jairam, M. R., Pagnoni, G., Goldsmith, D. R., Elfenbein, H. A., & Lilienfeld, S. O. (2007). Neural Correlates of Social Cooperation and Non-Cooperation as a Function of Psychopathy. *Biological Psychiatry*, *61*(11), 1260–1271. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2006.07.021>

Rodgers, R. J., & Dalvi, A. (1997). Anxiety, defence and the elevated plus-maze. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *21*(6), 801–810. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(96\)00058-9](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(96)00058-9)

Rodriguez-Ortiz, C. J., Baglietto-Vargas, D., Martinez-Coria, H., Frank, M., & Kitazawa, M. (2020). Up-regulation of miR-181 decreases c-Fos and SIRT-1 in the hippocampus of 3xTg-AD mice. *J Alzheimers Dis.*, *42*(4), 1229–1238. <https://doi.org/10.3233/JAD-140204>.Up-regulation

Rodríguez, S. M., Schafe, G. E., & LeDoux, J. E. (2004). Molecular mechanisms underlying emotional learning and memory in the lateral amygdala. *Neuron*, *44*, 75–91.

Rosenberger, L. A., Eisenegger, C., Naef, M., Terburg, D., Fourie, J., Stein, D. J., & van Honk, J. (2019). The Human Basolateral Amygdala Is Indispensable for Social Experiential Learning. *Current Biology*, *29*(20), 3532–3537.e3. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.08.078>

Rudebeck, P. H., Walton, M. E., Millette, B. H. P., Shirley, E., Rushworth, M. F. S., & Bannerman, D. M. (2007). Distinct contributions of frontal areas to emotion and social behaviour in the rat. *European Journal of Neuroscience*, *26*(8), 2315–2326. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05844.x>

Sah, P., Faber, E. S. L., Lopez de Armentia, M., & Power, J. (2003). The Amygdaloid Complex: Anatomy and Physiology. *Physiological Reviews*, *83*(3), 803–834. <https://doi.org/10.1152/physrev.00002.2003>

Saito, T., Suemoto, T., Brouwers, N., Slegers, K., Funamoto, S., Mihira, N., Matsuba, Y., Yamada, K., Nilsson, P., Takano, J., Nishimura, M., Iwata, N., Van Broeckhoven, C Ihara, Y., & Saido, T. . (2011).

Potent amyloidogenicity and pathogenicity of A β 43. *Nat Neurosci*, 14(8), 1023–1032.

Sandi, C., Venero, C., & Cordero, I. (2001). *Fisiología y patología del estrés. En: Sandi C, Venero C, Cordero I. (Eds.): Estrés. Memoria y trastornos asociados. Implicaciones en el daño cerebral y el envejecimiento* (Editorial Ariel SA (ed.)).

Sarkar, S., Jun, S., Rellick, S., Quintana, D. D. D., Cavendish, J. Z. Z., & Simpkins, J. W. W. (2016). Expression of microRNA-34a in Alzheimer's disease brain targets genes linked to synaptic plasticity, energy metabolism, and resting state network activity. *Brain Research*, 1646, 139–151. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2016.05.026>

Saúl, L. A., López-González, M. Á., Rubio-Garay, F., & Carrasco Ortiz, M. A. (2010). Evaluación de la memoria semántica: estudio transversal en personas sanas y en pacientes con enfermedad de Alzheimer. *Revista de Psicopatología y Psicología Clínica*, 15(3). <https://doi.org/10.5944/rppc.vol.15.num.3.2010.4097>

Scearce-Levie, K., Roberson, E. D., Gerstein, H., Cholfin, J. A., Mandiyan, V. S., Shah, N. M., Rubenstein, J. L. R., & Mucke, L. (2008). Abnormal social behaviors in mice lacking Fgf17. *Genes, Brain and Behavior*, 7(3), 344–354. <https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2007.00357.x>

Scheff, S. W., Sparks, D. L., & Price, D. A. (1993). Quantitative assessment of synaptic density in the entorhinal cortex in Alzheimer's disease. *Annals of Neurology*, 34(3), 356–361. <https://doi.org/10.1002/ana.410340309>

Seelye, A. M., Howieson, D. B., Wild, K. V., Moore, M. M., & Kaye, J. (2009). Wechsler Memory Scale–III Faces test performance in patients with mild cognitive impairment and mild Alzheimer's disease. *Journal of Clinical and Experimental Neuropsychology*, 31(6), 682–688. <https://doi.org/10.1080/13803390802484763>.Wechsler

Seibenhener, M. L., & Wooten, M. C. (2015). Use of the Open Field Maze to Measure Locomotor and Anxiety-like Behavior in Mice. *Journal of Visualized Experiments*, 96, 1–6. <https://doi.org/10.3791/52434>

Shamay-Tsoory, S. G., Aharon-Peretz, J., & Perry, D. (2009). Two systems for empathy: a double

dissociation between emotional and cognitive empathy in inferior frontal gyrus versus ventromedial prefrontal lesions. *Brain*, 132(3), 617–627. <https://doi.org/10.1093/brain/awn279>

Shao, W., Peng, D., & Wang, X. (2017). Genetics of Alzheimer's disease: From pathogenesis to clinical usage. *Journal of Clinical Neuroscience*, 45, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2017.06.074>

Shelton, A. L., & Gabrieli, J. D. E. (2002). Neural Correlates of Encoding Space from Route and Survey Perspectives. *Journal of Neuroscience*, 22(7), 2711–2717. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.22-07-02711.2002>

Shemesh, Y., Forkosh, O., Mahn, M., Anpilov, S., Sztainberg, Y., Manashirov, S., Shlapobersky, T., Elliott, E., Tabouy, L., Ezra, G., Adler, E. S., Ben-Efraim, Y. J., Gil, S., Kuperman, Y., Haramati, S., Dine, J., Eder, M., Deussing, J. M., Schneidman, E., ... Chen, A. (2016). Ucn3 and CRF-R2 in the medial amygdala regulate complex social dynamics. *Nature Neuroscience* 2016 19:11, 19(11), 1489–1496. <https://doi.org/10.1038/nn.4346>

Sheng, M., & Greenberg, M. E. (1990). The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. *Neuron*, 4(4), 477–485. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(90\)90106-P](https://doi.org/10.1016/0896-6273(90)90106-P)

Shrivastava, R., Sudhakar, T., & Prabhat, K. (2019). 2 nd INTERNATIONAL CONFERENCE ON ADVANCED COMPUTING AND SOFTWARE ENGINEERING. *Modeling of Basal Ganglia to Incorporate the Procedural Memory Rahul*, 1014–1024.

Snowden, J. S., Stopford, C. L., Julien, C. L., Thompson, J. C., Davidson, Y., Gibbons, L., Pritchard, A., Lendon, C. L., Richardson, A. M., Varma, A., Neary, D., & Mann, D. M. A. (2007). Cognitive Phenotypes in Alzheimer's Disease and Genetic Risk. *Cortex*, 43(7), 835–845. [https://doi.org/10.1016/S0010-9452\(08\)70683-X](https://doi.org/10.1016/S0010-9452(08)70683-X)

Snyder, H. M., Asthana, S., Bain, L., Brinton, R., Craft, S., Dubal, D. B., Espeland, M. A., Gatz, M., Mielke, M. M., Raber, J., Rapp, P. R., Yaffe, K., & Carrillo, M. C. (2016). Sex biology contributions to vulnerability to Alzheimer's disease: A think tank convened by the Women's Alzheimer's Research Initiative. *Alzheimer's & Dementia*, 12(11), 1186–1196. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2016.08.004>

Sodhi, R. K., Jaggi, A. S., & Singh, N. (2014). Animal models of dementia and cognitive dysfunction. *Life Sciences*. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2014.05.017>

Squire, L. R., & Zola-Morgan, S. (1991). The medial temporal lobe memory system. *Science*, *253*(5026), 1380–1386. <https://doi.org/10.1126/science.1896849>

St-Amour, I., Paré, I., Tremblay, C., Coulombe, K., Bazin, R., & Calon, F. (2014). IVIg protects the 3xTg-AD mouse model of Alzheimer's disease from memory deficit and A β pathology. *Journal of Neuroinflammation*, *11*, 1–16. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-11-54>

Stelzmann, R. A., Norman Schnitzlein, H., & Reed Murtagh, F. (1995). An english translation of alzheimer's 1907 paper, "über eine eigenartige erkankung der hirnrinde." *Clinical Anatomy*, *8*(6), 429–431. <https://doi.org/10.1002/ca.980080612>

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*, 149–155. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.06.011>

Sterniczuk, R., Dyck, R. H., Laferla, F. M., & Antle, M. C. (2010). Characterization of the 3xTg-AD mouse model of Alzheimer's disease: Part 1. Circadian changes. *Brain Research*, *1348*, 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.05.013>

Stevens, L. M., & Brown, R. E. (2015). Reference and working memory deficits in the 3xTg-AD mouse between 2 and 15-months of age: A cross-sectional study. *Behavioural Brain Research*, *278*, 496–505. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.10.033>

Stopford, C. L., Snowden, J. S., Thompson, J. C., & Neary, D. (2007). Distinct memory profiles in Alzheimer's disease. *Cortex*. [https://doi.org/10.1016/S0010-9452\(08\)70684-1](https://doi.org/10.1016/S0010-9452(08)70684-1)

Stopford, C. L., Snowden, J. S., Thompson, J. C., & Neary, D. (2008). Variability in cognitive presentation of Alzheimer's disease. *Cortex*. <https://doi.org/10.1016/j.cortex.2005.11.002>

Stover, K. R., Campbell, M. A., Van Winssen, C. M., & Brown, R. E. (2015). Early detection of cognitive deficits in the 3xTg-AD mouse model of Alzheimer's disease. *Behavioural Brain Research*,

289, 29–38. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.04.012>

Strittmatter, W. J., Weisgraber, K. H., Huang, D. Y., Dong, L. M., Salvesen, G. S., Pericak-Vance, M., Schmechel, D., Saunders, A. M., Goldgaber, D., & Roses, A. D. (1993). Binding of human apolipoprotein E to synthetic amyloid β peptide: Isoform-specific effects and implications for late-onset Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.17.8098>

Sturchler-Pierrat, C., Abramowski, D., Duke, M., Wiederhold, K. H., Mistl, C., Rothacher, S., Ledermann, B., Bürki, K., Frey, P., Paganetti, P. A., Waridel, C., Calhoun, M. E., Jucker, M., Probst, A., Staufenbiel, M., & Sommer, B. (1997). Two amyloid precursor protein transgenic mouse models with Alzheimer disease-like pathology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *94*(24), 13287–13292. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.24.13287>

Su, B., Wang, X., Zheng, L., Perry, G., Smith, M. ., & Zhu, X. (2010). Normal mitochondrial dynamics and neurodegenerative diseases. *Biochim Biophys Acta*, *1802*(1).

Suzuki, W. A. (2009). Perception and the Medial Temporal Lobe: Evaluating the Current Evidence (DOI:10.1016/j.neuron.2009.02.008). In *Neuron* (Vol. 61, Issue 6, p. 964). <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.03.002>

Suzuki, W. A., & Amaral, D. G. (2004). Functional neuroanatomy of the medial temporal lobe memory system. *Cortex*, *40*(1), 220–222. [https://doi.org/10.1016/S0010-9452\(08\)70958-4](https://doi.org/10.1016/S0010-9452(08)70958-4)

Swiergiel, A. H., & Dunn, A. J. (2008). *Effects of Interleukin 1 β and Lipopolysaccharide on Behavior of.pdf*. *86*(4), 651–659.

Tagliavata, G., Hogan, D., Zhang, W.-R., & Dineley, K. T. (2009). Intermediate- and long-term recognition memory deficits in Tg2576 mice are reversed with acute calcineurin inhibition. *Behavioural Brain Research*, *200*(1), 95–99. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.12.034>

Takehara-Nishiuchi, K. (2014). Entorhinal cortex and consolidated memory. *Neuroscience Research*, *84*, 27–33. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2014.02.012>

Tanimizu, T., Kenney, J. W., Okano, E., Kadoma, K., Frankland, P. W., & Kida, S. (2017). Functional connectivity of multiple brain regions required for the consolidation of social recognition memory. *Journal of Neuroscience*, *37*(15), 4103–4116. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3451-16.2017>

Ter Horst, J. P., van der Mark, M., Kentrop, J., Arp, M., van der Veen, R., de Kloet, E. R., & Oitzl, M. S. (2014). Deletion of the forebrain mineralocorticoid receptor impairs social discrimination and decision-making in male, but not in female mice. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *8*(February), 26. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2014.00026>

Tiwari, S., Altluri, V., Kaushik, A., Yndart, A., & Nair, M. (2019). Alzheimer's disease: pathogenesis, diagnostics, and therapeutics. *International Journal of Nanomedicine*, *14*, 5541–5554.

Torres-Lista, V., De la Fuente, M., & Giménez-Llort, L. (2017). Survival Curves and Behavioral Profiles of Female 3xTg-AD Mice Surviving to 18-Months of Age as Compared to Mice with Normal Aging. *Journal of Alzheimer's Disease Reports*, *1*(1), 47–57. <https://doi.org/10.3233/adr-170011>

Tovote, P., Fadok, J. P., & Lüthi, A. (2015). Neuronal circuits for fear and anxiety. *Nature Reviews Neuroscience*, *16*(6), 317–331. <https://doi.org/10.1038/nrn3945>

Trouillet, A.-C., Keller, M., Weiss, J., Leinders-Zufall, T., Birnbaumer, L., Zufall, F., & Chamero, P. (2019). Central role of G protein $G\alpha_2$ and $G\alpha_2+$ vomeronasal neurons in balancing territorial and infant-directed aggression of male mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *116*(11), 5135–5143. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1821492116>

Tsao, D. Y. (2006). A Cortical Region Consisting Entirely of Face-Selective Cells. *Science*, *311*(5761), 670–674. <https://doi.org/10.1126/science.1119983>

Tudorică, V., Bălșeanu, T.-A., Albu, V.-C., Bondari, S., Bumbea, A.-M., & Pîrșcoveanu, M. (2017). Tau protein in neurodegenerative diseases-a review DENISA FLORIANA VASILICA PÎRȘCOVEANU 1) , IONICA PIRICI. *Rom J Morphol Embryol*, *58*(4), 1141–1150.

Twining, R. C., Vantrease, J. E., Love, S., Padival, M., & Rosenkranz, J. A. (2017). An intra-amygdala circuit specifically regulates social fear learning. *Nature Neuroscience* 2017 20:3, *20*(3), 459–469.

<https://doi.org/10.1038/nn.4481>

Vallar, G. (2017). *Short-Term Memory* (E. R. C. In & N. and B. Psychology (eds.)).

Vassar, R., Bennett, B. D., Babu-Khan, S., Kahn, S., Mendiaz, E. A., Denis, P., Teplow, D. B., Ross, S., Amarante, P., Loeloff, R., Luo, Y., Fisher, S., Fuller, J., Edenson, S., Lile, J., Jarosinski, M. A., Biere, A. L., Curran, E., Burgess, T., ... Citron, M. (1999). β -Secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.286.5440.735>

Villarejo Galende, A., Eimil Ortiz, M., Llamas Velasco, S., Llanero Luque, M., López de Silanes de Miguel, C., & Prieto Jurczynska, C. (2017). Informe de la Fundación del Cerebro. Impacto social de la enfermedad de Alzheimer y otras demencias. *Neurología*. <https://doi.org/10.1016/j.nrl.2017.10.005>

Virúes-Ortega, J., de Pedro-Cuesta, J., Vega, S., Seijo-Martínez, M., Saz, P., Rodríguez, F., Rodríguez-Laso, Á., Reñé, R., de las Heras, S. P. P., Mateos, R., Martínez-Martín, P., Mahillo-Fernández, I., López-Pousa, S., Lobo, A., Reglà, J. L. L., Gascón, J., García, F. J. J., Fernández-Martínez, M., Boix, R., ... del Barrio, J. . L. (2011). Prevalence and European comparison of dementia in a ≥ 75 -year-old composite population in Spain. *Acta Neurologica Scandinavica*, 123(5), 316–324. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0404.2010.01398.x>

Vogt, B. A. (2019). Cingulate cortex in the three limbic subsystems. In *Handbook of Clinical Neurology* (1st ed., Vol. 166). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64196-0.00003-0>

Waddell, J., Bangasser, D. A., & Shors, T. J. (2008). The basolateral nucleus of the amygdala is necessary to induce the opposing effects of stressful experience on learning in males and females. *Journal of Neuroscience*, 28(20), 5290–5294. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1129-08.2008>

Wagner, U., Hallschmid, M., Rasch, B., & Born, J. (2006). Brief sleep after learning keeps emotional memories alive for years. *Biol Psychiatry*. *Biol Psychiatry*, 788–790.

Walsh, D. ., & D.J, S. (2007). A beta oligomers - a decade of discovery. *J Neurochem*, 101(5), 1172-84.

Walsh, R. N., & Cummins, R. A. (1976). The open-field test: A critical review. *Psychological Bulletin*, 83(3), 482–504. <https://doi.org/10.1037/0033-2909.83.3.482>

Wang, Y., Zhao, S., Liu, X., & Fu, Q. (2014). Effects of the medial or basolateral amygdala upon social anxiety and social recognition in mice. *Turk J Med Sci*, 44(3), 353–359. <https://doi.org/10.3906/sag-1301-2>

Wassum, K. M., & Izquierdo, A. (2015). The basolateral amygdala in reward learning and addiction. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 57, 271–283. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2015.08.017>

Weingarten, M. D., Lockwood, A. H., Hwo, S. Y., & Kirschner, M. W. (1975). A Protein Factor Essential for Microtubule Assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 72(5), 1858–1862.

Weller, J., & Budson, A. (2018). Current understanding of Alzheimer's disease diagnosis and treatment. *F1000Research*, 7(0), 1–9. <https://doi.org/10.12688/f1000research.14506.1>

Wiseman, F. K., Al-Janabi, T., Hardy, J., Karmiloff-Smith, A., Nizetic, D., Tybulewicz, V. L. J., Fisher, E. M. C., & Strydom, A. (2015). A genetic cause of Alzheimer disease: Mechanistic insights from Down syndrome. In *Nature Reviews Neuroscience*. <https://doi.org/10.1038/nrn3983>

Witter, M. P., Wouterlood, F. G., Naber, P. A., & Van Haeften, T. (2000). Anatomical organization of the parahippocampal-hippocampal network. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 911, 1–24. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb06716.x>

Yao, H., Liu, Y., Zhou, B., Zhang, Z., An, N., Wang, P., Wang, L., Zhang, X., & Jiang, T. (2013). Decreased functional connectivity of the amygdala in Alzheimer's disease revealed by resting-state fMRI. *European Journal of Radiology*, 82(9), 1531–1538. <https://doi.org/10.1016/j.ejrad.2013.03.019>

Yoshiyama, Y., Higuchi, M., Zhang, B., Huang, S. M., Iwata, N., Saido, T. C. C., Maeda, J., Suhara, T., Trojanowski, J. Q., & Lee, V. M. Y. (2007). Synapse Loss and Microglial Activation Precede Tangles in a P301S Tauopathy Mouse Model. *Neuron*, 53(3), 337–351.

<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.01.010>

Younkin, S. G. (1995). Evidence that A β 42 is the real culprit in alzheimer's disease. *Annals of Neurology*, 37(3), 287–288. <https://doi.org/10.1002/ana.410370303>

Zempel, H., Thies, E., Mandelkow, E., & Mandelkow, E.-M. (2010). A Oligomers Cause Localized Ca²⁺ Elevation, Missorting of Endogenous Tau into Dendrites, Tau Phosphorylation, and Destruction of Microtubules and Spines. *Journal of Neuroscience*, 30(36), 11938–11950. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2357-10.2010>

Zink, C. F., Tong, Y., Chen, Q., Bassett, D. S., Stein, J. L., & Meyer-Lindenberg, A. (2008). Know Your Place: Neural Processing of Social Hierarchy in Humans. *Neuron*, 58(2), 273–283. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.01.025>

Zokaei, N., Sillence, A., Kienast, A., Drew, D., Plant, O., Slavkova, E., Manohar, S. G., & Husain, M. (2020). Different patterns of short-term memory deficit in Alzheimer's disease, Parkinson's disease and subjective cognitive impairment. *Cortex*, 132, 41–50. <https://doi.org/10.1016/j.cortex.2020.06.016>