



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas

“Evaluación del deterioro olfativo causado por inyección de beta amiloide en hipocampo y bulbo olfatorio”

T E S I S

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

PRESENTA

MC. Carlos Ernesto Bernal Mondragón

Tutor principal:

Dra. Rosalinda Guevara Guzmán.

Facultad de Medicina U.N.A.M.

Comité tutor:

Dra. Selva Rivas Arancibia

Facultad de Medicina U.N.A.M.

Dr. Alfonso Escobar Izquierdo

Instituto de Investigaciones Biomédicas U.N.A.M.

México D.F. Junio de 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado asignado:

Presidente:	Dr. Jorge Guevara Fonseca
Secretario:	Dra. Rosalinda Guevara Guzmán
Vocal:	Dra. Lourdes Massieu Trigo
Vocal:	Dra. Clorinda Arias Álvarez
Vocal:	Dra. Luisa Rocha Arrieta

Este proyecto de investigación se realizó dentro del Programa de Doctorado de Ciencias Biomédicas de la UNAM y se llevó a cabo en el Laboratorio Sensorial 412, Departamento de Fisiología, Edificio A, 4º piso, Facultad de Medicina, UNAM

Este trabajo de investigación recibió apoyo del CONACyT No.152613 y como becario No. 215706; PAPIIT No. 216907

Tutor:

DRA. ROSALINDA GUEVARA GUZMAN

Comité tutor:

DRA. SELVA RIVAS ARANCIBIA

DR. ALFONSO ESCOBAR IZQUIERDO

Sustentante:

CARLOS BERNAL MONDRAGÓN

Índice general	
Agradecimientos.....	5
Resumen.....	6
1. INTRODUCCIÓN.....	8
2. ANTECEDENTES	10
2.1 La enfermedad de Alzheimer.	10
2.2 Factores de riesgo de la enfermedad de Alzheimer	11
2.3 Estadios de la enfermedad de Alzheimer.	12
2.4 Diagnóstico actual de la Enfermedad de Alzheimer	13
2.5 Marcadores histopatológicos de la Enfermedad de Alzheimer	15
3. EL PÉPTIDO BETA AMILOIDE.....	17
3.1 Función del β -A.....	18
4. ALTERACIONES OLFATORIAS EN PACIENTES CON ENFERMEDAD DE ALZHEIMER..	21
5. MODELOS TRANSGÉNICOS	24
6. VÍA OLFATORIA.....	25
6.1 Receptores olfatorios.....	25
6.2 Bulbo olfatorio	25
6.3 Cintilla olfatoria.....	26
6.4 Lóbulo olfatorio	26
6.5 Comisura anterior.....	27
7. HIPOCAMPO.....	29
7.1 Aspectos generales	29
7.2 Anatomía.....	29
7.3 Conexiones eferentes.....	30

7.4 Conexiones aferentes.....	31
7.5 Hipocampo y memoria.....	31
8. OLFATO Y MEMORIA.....	34
9. BETA AMILODE 25-35	36
9.1 Hipótesis	36
9.2 Objetivo general	37
9.3 Objetivos específicos.....	37
10. DISEÑO EXPERIMENTAL	38
10.1 Justificación:	38
10.2 Material y métodos	38
10.2.a Inyección de β -A.....	39
10.2.b Prueba de memoria de reconocimiento social.....	41
10.2.c Pruebas de percepción olfatoria y habituación	42
10.2.d Prueba de conducta de alternancia espontánea en laberinto en "T"	44
10.2.e Medición de lipoperoxidación (LPO)	45
10.2.f Western blot para 4-Hydroxinonenal.....	46
10.2.g Tinción con fluorojade	46
11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	48
12. RESULTADOS.....	50
13. DISCUSIÓN.....	59
14. CONCLUSIONES.....	66
Referencias	67
Anexo	

Agradecimientos

Técnicos

Quiero agradecer profundamente a todas las personas que me apoyaron en todo momento en la realización del posgrado. Especialmente agradezco a la Dra. Rosalinda Guevara Guzmán, por su gran apoyo desde el inicio del programa, por sus ideas, discusiones y consejos, por mostrar siempre una fuerza incansable y una actitud propositiva, un ánimo que contagia; un gran ejemplo a seguir para mí. A la Dra. Selva Rivas por todo su apoyo en solucionar los problemas que se presentaban en el camino, y por darme tanto ánimo en momentos difíciles. A el Dr. Alfonso Escobar, por su atenta escucha y múltiples ideas. A Josefina Bolado, por su infinita paciencia, por todas risas y situaciones gratas que compartimos durante estos años, por ser una excelente amiga y gran apoyo en todo momento. A todos mis compañeros de laboratorio quienes en su momento fueron excelentes maestros y amigos, apoyándome siempre en todas las fases del posgrado.

Al CONACyT y PAPIIT por el apoyo otorgado, sin el cual la realización de este trabajo no hubiera sido posible.

Personales.

Quiero darle las gracias a una persona muy especial que ya no está aquí conmigo, pero que fue el motor que me impulsó y apoyó desde siempre, no solo para estudiar medicina y un posgrado, sino para ser cada día una mejor persona. Muchas gracias papá por todo tu apoyo, todo tu amor y cariño, esta tesis está dedicada a ti.

A mi mamá y hermana, mis dos Lupitas, quienes han estado conmigo siempre, dando aliento y ánimo en los buenos momentos y en los malos, este es un logro más que comparto con ustedes, gracias mumie y hermie

A Naoli Victoria Lona, la más especial de las personas, cuyo apoyo fue fundamental para la conclusión del posgrado, gracias por sacar nuevamente en mí esa creatividad y ánimo por seguir adelante en este nuevo equipo.

Resumen

El deterioro olfativo es un signo clínico de algunas enfermedades neurodegenerativas, entre ellas la enfermedad de Alzheimer. Este signo aparece en las etapas tempranas de la enfermedad, incluso manifestándose antes de que el deterioro cognitivo sea evidente clínicamente [1,2,3]. La afectación de las facultades cognitivas y alteraciones en el metabolismo de la glucosa cerebral están relacionadas con la presencia de beta amiloide (β -A) en el cerebro de personas con Alzheimer [4]. El β -A es un péptido que en estados patológicos forma depósitos extracelulares llamados placas amiloideas. El β -A es un péptido neurotóxico que afecta a las neuronas por diversos mecanismos, entre ellos la generación de estrés oxidativo. Diferentes reportes señalan que la fracción del péptido β -A que tiene efecto neurotóxico mediante estrés oxidativo, es la fracción 25-35 [5, 6, 7]. En distintos modelos de estrés oxidativo como en hipoxia o en exposición a ozono, se ha observado una disminución de este estrés con la administración de 17 β -estradiol, debido a su capacidad antioxidante [8]. El objetivo del presente trabajo fue analizar el efecto neuroprotector del 17 β -estradiol en un modelo animal, al cual se le administró el péptido β -A en dos estructuras del sistema nervioso central: en el bulbo olfatorio (BO) y en la región CA1 del hipocampo. Se utilizaron ratas hembras de la cepa Wistar, las cuales fueron mantenidas en un régimen de luz de 12/12, con comida y bebida *ad libitum*.

Se analizó el daño neuronal producido por el β -A en las estructuras cerebrales inyectadas mediante la cuantificación de la lipoperoxidación; y la observación del daño neuronal mediante la tinción con fluorojade. Se observó deterioro en la conducta olfatoria, así como daño neuronal en los individuos inyectados en hipocampo, contrario o lo encontrado en aquellos sujetos inyectados en el bulbo olfatorio. Pudo observarse también un efecto neuroprotector en los sujetos inyectados previamente con 17 β - estradiol reflejándose en un menor daño neuronal y en una conservación de la conducta olfatoria.

1. INTRODUCCIÓN

El beta amiloide (β -A) es un péptido relacionado con la enfermedad de Alzheimer (EA). El acúmulo de este péptido es el producto del procesamiento aumentado de la proteína precursora de beta amiloide (APP por sus siglas en inglés) así como también por alteraciones en el proceso de degradación. La sobre producción de este péptido, así como la disminución en su degradación, dan como resultado la formación de acúmulos conocidos como placas amiloideas [4].

Se ha demostrado la toxicidad neuronal del β -A en varios modelos mediante diversos mecanismos entre los que destacan el estrés oxidativo producido por especies reactivas al oxígeno [5]. En modelos murinos se ha demostrado el deterioro de la memoria espacial posterior a la administración de beta amiloide en el hipocampo [6]. Así también se ha identificado a la fracción 25-35 como la parte del péptido que tiene la capacidad de producir especies reactivas al oxígeno [7].

Diferentes reportes señalan que la mayor incidencia de la EA ocurre en mujeres post menopáusicas comparado con la de los hombres de la misma edad; esto sugiere que la presencia de estrógenos puede jugar un papel neuroprotector [8, 9, 10]. También se ha reportado ampliamente la actividad antioxidante de los estrógenos, principalmente del 17 β - estradiol, así como la capacidad de esta hormona en prevenir el daño neuronal en

otros modelos de estrés oxidativo como en el caso de la exposición a ozono [8].

El deterioro en la capacidad olfativa es un signo temprano de la EA [2,11]. Se ha propuesto que esta alteración olfatoria puede servir como un método diagnóstico temprano de esta enfermedad, y de esta manera poder indicar un tratamiento adecuado lo más tempranamente posible [2,11]. En los cerebros de pacientes con Alzheimer se ha encontrado evidencia de la presencia de β -A en el bulbo olfatorio. Aún cuando se ha reportado una disfunción olfatoria temprana en la EA, no existen evidencias de si el deterioro se inicia en las estructuras periféricas como epitelio y bulbo olfatorio o en las estructuras olfatorias centrales como corteza piriforme, entorrinal o hipocampal, las cuales son responsables de la memoria olfatoria [11,12].

El deterioro olfativo causado por la neurodegeneración en el hipocampo no ha sido evaluado en un modelo animal de Alzheimer; más específicamente, el deterioro de la memoria olfatoria de corto plazo, la cual se vería afectada al existir un daño hipocampal.

2. ANTECEDENTES

2.1 La enfermedad de Alzheimer.

Esta enfermedad fue descrita en 1901 por el psiquiatra alemán Alois Alzheimer. La EA es una patología neurodegenerativa crónica irreversible e incurable a la fecha y es considerada actualmente como la primera causa de demencia [13]. La descripción de esta enfermedad fue dada a conocer en 1906 en donde Alzheimer mostró las características clínicas y neuropatológicas de un estado de demencia que se relacionaba con la presencia de ciertos marcadores histopatológicos característicos, las placas de beta amiloide y las llamadas marañas neurofibrilares [14]. La EA es la primera causa de demencia en el mundo. La incidencia se va incrementando desde el 1% entre los 60 y 70 años de edad, hasta el 6 al 8% en los mayores de 85 años en quienes la proporción llega a ser del 30% [15]. En México se ha calculado que hasta el 7% de los adultos mayores padecen algún tipo de deterioro cognitivo siendo el más frecuente la EA [16].

En México se prevé que para el año 2050 habrá un incremento en la población de adultos mayores, de aproximadamente el 21.2% según las proyecciones del Consejo nacional de Población. Razón por la cual se estima también que la cantidad de personas con posibilidad de desarrollar la EA se verá aumentada. Esto tendrá una repercusión económica debido al costo del tratamiento de la enfermedad, de su cuidado y de la duración de la misma.

Debido a lo anterior, es importante tener herramientas para un diagnóstico temprano que permita realizar una intervención oportuna con tratamientos específicos y adecuados para aminorar las complicaciones, retardar el deterioro cognitivo y mejorar la calidad de vida del paciente y de la persona que esté a su cuidado.

2.2 Factores de riesgo de la enfermedad de Alzheimer

Existen dos clases de EA: la familiar y la esporádica. La EA familiar tiene un origen genético y la esporádica tiene orígenes diversos [4]. Sin embargo, a la fecha no se conoce con exactitud la etiología de esta enfermedad.

La EA familiar representa alrededor de entre el 5 y 10 por ciento del total de casos mientras que la de tipo esporádico, el 90 y 95%.

La aparición temprana de la EA familiar representa menos del 5% de los individuos afectados. El riesgo de desarrollarla puede aumentar 2 a 4 veces entre las personas que tienen un familiar de primer grado con la enfermedad, y puede aumentar aún más cuando dos o más familiares están afectados. En las familias con el patrón de herencia autosómico dominante, el riesgo de enfermedad de Alzheimer familiar es del 50%. Los individuos homocigotos o heterocigotos para el alelo APOE4 o aquellos con antecedentes familiares de EA en uno de los padres o un hermano pueden ser considerados de alto riesgo. La edad es el factor de riesgo más importante. La incidencia y prevalencia de la enfermedad se duplica cada cinco años a partir de los 65 años de edad [17].

La EA de tipo esporádico es la más prevalente, llegando hasta el 95 por ciento de los casos registrados, y se le llama esporádico porque no existe un factor etiológico identificado que logre explicar su origen.

La EA de tipo esporádico se presenta comúnmente después de los 65 años, y aunque no hay un factor único que de origen a esta enfermedad, la edad es el principal factor de riesgo. Existen otros factores de riesgo como el género femenino, la hipertensión arterial sistémica, la obesidad, aumento de triglicéridos y colesterol y traumatismo craneoencefálico entre otros. La presencia de estos factores de riesgo puede aumentar la probabilidad de desarrollar la enfermedad [18].

2.3 Estadios de la enfermedad de Alzheimer.

La EA presenta tres estadios o etapas, clínicamente identificables, según el Manual de diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales (DSM IV) [19].

La primera etapa se caracteriza por un deterioro gradual y progresivo de la memoria [19].

En la segunda etapa, de dos a tres años, aparece desorientación espacial creciente, pérdida de las capacidades del lenguaje y comportamiento inapropiado. Pueden presentarse alucinaciones o ideas delirantes. Se presenta un deterioro en las funciones cognitivas, presentándose apraxias (trastornos motores), afasia (imposibilidad de comunicación) y agnosia (imposibilidad de reconocimiento).

En la tercera etapa o etapa avanzada se presenta un profundo deterioro en las funciones cognitivas acompañado por trastornos motrices, asociados a incontinencia urinaria y fecal, alteraciones de la postura y de la marcha. En esta etapa de la enfermedad, el paciente con Alzheimer es incapaz de realizar funciones básicas de sobrevivencia, como alimentarse o asearse, por lo que requiere de la ayuda de un cuidador para sobrevivir [19].

2.4 Diagnóstico actual de la enfermedad de Alzheimer.

Lo más común para realizar el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer son las pruebas cognitivas que se utilizan de manera rutinaria para determinar el grado de demencia clínica. Sin embargo, estas pruebas no dan un diagnóstico de certeza, y solo presentan un diagnóstico significativo cuando el paciente se encuentra en etapas tardías de la enfermedad.

No existe una prueba específica que permita el diagnóstico temprano y definitivo de la EA, y esto ha propiciado que se busquen alternativas que combinen diferentes herramientas. Desafortunadamente solo se puede corroborar la existencia de la EA, a través del estudio patológico del cerebro y encontrar la presencia de los biomarcadores como las placas amiloideas y marañas neurofibrilares [4]. Algunas de las técnicas que actualmente se utilizan para el diagnóstico clínico de la EA son:

La tomografía por emisión de positrones recientemente se ha incorporado a la batería de pruebas diagnósticas, detectando un compuesto llamada componente B Pittsburg PiB. Este compuesto es capaz de unirse selectivamente a los depósitos de β -A en el cerebro humano [20].

Tomografía por emisión de positrones con componente Pittsburg B. Esta técnica permite la detección de placas de β -A en regiones específicas como la corteza cerebral y, el hipocampo en etapas intermedias y tardías [21]; la principal limitante de este método es su alto costo, por lo que en la práctica, se le ha dado preferencia a la resonancia magnética (MRI)[12], que además permite obtener imágenes detalladas del volumen cortical, de los ventrículos, y del hipocampo, a través de la señal magnética por alineación de los átomos de hidrógeno y no con radiación iónica como en la tomografía.

La obtención de imágenes por MRI permite hacer un diagnóstico más aproximado de la enfermedad, su costo es menor aunque continúa siendo elevado.

Otro método para realizar el diagnóstico de EA es la cuantificación de β -A soluble y la determinación de proteína Tau en líquido cefalorraquídeo (LCR) [22].

En las primeras etapas de la enfermedad de Alzheimer la concentración de β -A se encuentra elevada en el LCR y a medida que

progresar, la concentración disminuye debido a que comienza la aparición de los depósitos de β -A en las estructuras cerebrales [23]. En combinación con los niveles de β -A, el aumento de la proteína Tau está relacionado con el grado de avance en la enfermedad. La presencia de ambos biomarcadores en el LCR permite diferenciar este tipo de demencia de entre otros tipos como la demencia de tipo vascular o la demencia fronto temporal [24].

Otra técnica usada en el diagnóstico de la enfermedad es el electroencefalograma (EEG). En los pacientes con EA se ha reportado un enlentecimiento del EEG reflejado en una disminución de las ondas cerebrales rápidas acompañadas de un aumento de las oscilaciones lentas. Además, se ha observado que los pacientes con EA presentan actividad electroencefalográfica con bajo índice de coherencia entre las estructuras cerebrales, lo que se asocia con una desincronización cortical [25].

2.5 Marcadores histopatológicos de la enfermedad de Alzheimer.

Hay tres marcadores histopatológicos patognomónicos de la enfermedad de Alzheimer; éstos son las placas de β -A, las marañas neurofibrilares de proteína Tau y la microglía activada [4]. Las marañas neurofibrilares están constituidos por filamentos helicoidales de proteína Tau fosforilada y se distribuyen dentro del soma de la neurona. Estas marañas se producen cuando la proteína Tau es hiperfosforilada, lo que provoca su agregación en un estado insoluble que se acumula en el interior de las neuronas. La

proteína Tau tiene como función mantener los dímeros de tubulina que forman el citoesqueleto de la neurona, por lo que al cesar su función, se ve comprometida la estructura de la célula [4].

Por otro lado, las placas de β -A son depósitos extra neuronales del péptido beta amiloide. El aumento en la concentración de β -A ha sido asociado a cambios patológicos como por ejemplo atrofia cerebral [26].

3. EL PÉPTIDO BETA AMILOIDE

Este péptido se produce por el procesamiento de la proteína precursora de β -A, APP por sus siglas en inglés; el gen de esta proteína se localiza en el cromosoma 21 en los humanos [4]. Esta proteína se presenta en tres isoformas: la APP695, la APP751 y la APP 770 con diferentes longitudes de la cadena polipeptídica. Las primeras dos se encuentran distribuidas ampliamente en diferentes tejidos como el adiposo, hepático, cardiaco entre otros, mientras que las APP695 se encuentran principalmente en el tejido neuronal y en la glía [4].

La proteína precursora es una glicoproteína de membrana altamente conservada cuyo procesamiento se realiza principalmente por tres secretasas alfa, beta y gama.

La APP es procesada principalmente por dos vías, la vía amiloidogénica y la no amiloidogénica. En la vía no amiloidogénica participan las alfa y las gama secretasas y se producen varios péptidos pero no el péptido beta amilode; mientras que en la vía amilodogénica actúan la proteína alfa y gama secretasas y se producen diferentes péptidos; es en esta vía en donde se genera el β -A [4].

El β -A puede constar de 39 a 42 aminoácidos; el β -A 1-42 es la isoforma que tiende a formar más oligómeros y por consecuencia a precipitarse y a acumularse en las estructuras cerebrales [27].

3.1 Función del β -A

Existe una amplia bibliografía acerca de los efectos patológicos del beta amiloide tanto *in vivo* como *in vitro*; sin embargo, el β -A parece desempeñar también un papel importante en diversas funciones cerebrales [28]. Se ha demostrado que el β -A, a concentraciones fisiológicas, tiene efectos neurotróficos, promueve los mecanismos de plasticidad sináptica y favorece los procesos de aprendizaje y memoria.

La presencia de β -A en el hipocampo no es constante ya que sigue un patrón circadiano dependiente del proceso sueño vigilia, tanto en ratones como en humanos [29]. El β -A tiene un papel neurotrófico en neuronas de hipocampo a bajas concentraciones. Se ha demostrado un aumento en la diferenciación de células trocales en presencia de β -A 1-40 así como también un mayor crecimiento de las proyecciones axonales y dendríticas [30,] estos datos apuntan a que la función fisiológica de β -A es neurotrófica y neuroprotectora. Se ha visto, de hecho, que el β -A protege contra el daño por excitotoxicidad causada por N-metil -D- aspartato (NMDA) en cultivos neuronales [31].

La administración de β -A en rebanadas de hipocampo a concentraciones picomolares, incrementa los procesos de plasticidad sináptica, como es la potenciación de largo plazo [32].

El β -A, a concentraciones fisiológicas, también puede modular la transmisión colinérgica (ACH) a través de la interacción directa con

receptores nicotínicos. La activación de nAChR por β -A puede desencadenar cambios en la transmisión sináptica tanto a nivel presináptico como postsináptico [33]. La entrada de calcio a través de estos receptores en la presinapsis promueve el reclutamiento y liberación de las vesículas sinápticas, mientras que en la post sinapsis, la activación de los nAChR disminuye el umbral de la activación de los receptores glutamatérgicos tipo AMPA y NMDA además de aumentar la excitabilidad neuronal [34].

Si bien los datos anteriores indican que β -A tiene funciones fisiológicas, alteraciones en los mecanismos responsables de la síntesis y degradación del β -A provocan una acumulación constante, y por consecuencia deterioro cognitivo progresivo.

El β -A en concentraciones nanomolares provoca una serie de alteraciones que repercuten en la función de distintos circuitos neuronales hipocampales, entre ellas, la endocitosis de vesículas sinápticas [35]; y el deterioro del LTP (potenciación a largo plazo por sus siglas en inglés) [36].

El β -A puede inhibir el establecimiento del LPT el hipocampo, y de esta manera alterar los procesos de memoria y aprendizaje [36]. El aumento de la concentración de β -A puede exacerbar otro tipo de plasticidad sináptica conocida como la depresión a largo plazo (LTD por sus siglas en inglés) [37].

Ésta llevará eventualmente a la retracción de las espinas dendríticas lo que se ha relacionado con alteraciones conductuales, afectando significativamente los procesos de aprendizaje y memoria.

El sistema colinérgico, involucrado estrechamente con los procesos de memoria y aprendizaje, es afectado también por la presencia de β -A [38].

Se ha reportado que inyecciones de β -A son capaces de alterar el funcionamiento de los circuitos neuronales de manera aguda y por lo tanto alterar la conducta de memoria aprendizaje [39]. La afectación de la actividad del hipocampo, repercute en la disminución del desempeño de los animales en tareas cognitivas [23,40] similar a lo que ocurre a los pacientes con EA.

4. ALTERACIONES OLFATORIAS EN PACIENTES CON ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

La capacidad olfatoria se encuentra deteriorada en las primeras etapas de la enfermedad de Alzheimer, incidiendo primariamente en el umbral y discriminación olfatoria, lo que convierte a este signo en un posible indicador para realizar un diagnóstico oportuno de la enfermedad. La continua búsqueda de métodos diagnósticos para la detección de la EA, principalmente en sus etapas tempranas, para poder instaurar un tratamiento adecuado oportuno y proporcionar una mejor calidad de vida al paciente, ha llevado a estudiar la disfunción olfatoria que parece ocurrir en etapas tempranas de esta enfermedad.

El sistema olfatorio es el único que transmite sus señales directamente a la corteza cerebral sin hacer relevo en el tálamo [41] además de que tiene una relación estrecha con el sistema límbico. La olfacción está involucrada en procesos de memoria y aprendizaje por lo que recientemente se ha considerado el deterioro olfativo como un indicador temprano del deterioro cognitivo, [42]. Pacientes que manifestaban diversas demencias, entre ellas la EA, mostraban un deterioro en la capacidad olfatoria. Warner en 1986 realizó estudios en los cuales se utilizaba la prueba "The smell identification test" de la Universidad de Pensilvania (UPSIT)[43], y que consiste en la discriminación e identificación olfativa de 40 olores; esta prueba tiene el propósito de identificar el rango de sensación y de percepción de los olores

en humanos. Se comprobó que las personas que padecían EA presentaban un mayor número de errores en la identificación de olores comparado con el del grupo control. Este estudio demostró además que el deterioro olfativo ocurre de manera temprana, y que correlaciona con el estado de demencia de los pacientes [44]. Con base en los resultados obtenidos se ha postulado la idea de usar un método de detección de olores como una herramienta alternativa de bajo costo y que sea accesible para el diagnóstico temprano de la EA [45].

Existe una relación entre el deterioro olfativo y la disminución del grosor cortical e hipocampal en pacientes con EA [46] la detección del deterioro olfativo puede ser útil si se detecta de manera temprana.

El deterioro olfativo puede ser debido a la presencia de placas de β -A en pacientes con EA, sin embargo, éstas no se han reportado claramente en etapas tempranas [47]. Queda la duda si se buscaron específicamente en el epitelio o en el bulbo olfatorio, lo que permitiría explicar el deterioro olfativo que reportan los pacientes en la etapa inicial de la enfermedad. Sin embargo, se han encontrado evidencias de neurodegeneración en el núcleo olfatorio anterior y alteraciones a nivel del nervio olfatorio en pacientes con EA en etapa tardía [48], lo que hace pensar que quizás las alteraciones olfatorias tempranas se deban a la alteración de otras estructuras de la vía olfatoria que se ven afectadas en la etapa inicial de la

enfermedad o a que no se ha puesto atención para localizarlas en el epitelio o bulbo olfatorio.

5. MODELOS TRANSGÉNICOS

La identificación de los genes causantes de la EA familiar, ha permitido el desarrollo de modelos con ratones transgénicos que, al sobre expresar dichos genes, producen alteraciones que se asemejan a la enfermedad de Alzheimer. Entre las alteraciones que presentan dichos ratones se presenta un deterioro olfatorio [49].

Se demostró que los ratones que sobre expresan la isoforma de la APP 695 tienen un pobre desempeño en la conducta de discriminación olfativa. En las pruebas histoquímicas en dichos ratones, se encontró que la deficiencia olfatoria se correlacionaba con la concentración de β -A. Se ha sugerido una relación causal entre el péptido β -A y el deterioro temprano de la capacidad olfativa tanto en ratones como en seres humanos [49,50].

Para comprender mejor la relación de las estructuras olfatorias, a continuación se describe esta vía:

6. VÍA OLFATORIA

6.1 Receptores olfatorios.

La mucosa olfatoria es un epitelio especializado que se encuentra en la parte superior de la cavidad nasal. Las delicadas prolongaciones centrales, que constituyen los filetes olfatorios de tipo amielínicos, convergen para formar fascículos y pasan desde la cavidad nasal a través de los orificios de la lámina cribosa del hueso etmoides. Estas fibras penetran en la cara ventral del bulbo olfatorio. Los filetes olfatorios constituyen en conjunto el nervio olfatorio, (51) el cual va a hacer sinapsis con la dendrita principal de las células mitrales del BO y formar los glomérulos olfatorios.

6.2 Bulbo olfatorio.

Esta estructura descansa sobre la lámina cribosa del hueso etmoides. Está compuesta por varias capas, de afuera hacia adentro se encuentran: capa glomerular, capa plexiforme externa, capa de células mitrales, capa plexiforme interna y capa de células granulosas. Los axones de las células mitrales forman el tracto olfatorio lateral que va a establecer sinapsis con las células de los núcleos olfatorios anteriores, tubérculo olfatorio para finalizar en la corteza piriforme. También encontramos células en penacho y granulares, las cuales mantienen conexiones dendrodendríticas entre ellas. Las células granulares liberan un neurotransmisor, GABA que inhibe a las células mitrales y éstas a su vez liberan el neurotransmisor glutamato, que excita a las células granulares. Caudal al bulbo olfatorio se encuentra el núcleo olfatorio anterior. Los axones

de las células del núcleo olfatorio anterior se dirigen centralmente, se cruzan en la parte rostral de la comisura anterior y entran en el núcleo olfatorio anterior y de aquí se proyectan al bulbo olfatorio del lado opuesto [51].

6.3 Cintilla olfatoria.

Esta vía pasa hacia la sustancia perforada anterior (tubérculo olfatorio en animales) y se divide en estrías olfatorias interna (medial) y externa (lateral). Una delgada cubierta de sustancia gris ubicada sobre las estrías olfatorias compone las circunvoluciones olfatorias interna (medial) y externa (lateral). La estría y la circunvolución olfatorias llegan a la región prepiriforme. Estas fibras terminan en la corteza prepiriforme y en la parte corticomedial del complejo nuclear amigdalino [51].

6.4 Lóbulo olfatorio.

Está separado de la cara lateral del palio córtex por el surco olfatorio. La parte posterior se diferencia en el área olfatoria (sustancia perforada anterior, o tubérculo olfatorio) y en algunas otras estructuras olfatorias estrechamente relacionadas con la parte anteromedial del lóbulo temporal y que en conjunto reciben el nombre de lóbulo piriforme. La corteza prepiriforme y el área periamigdalina reciben fibras de la estría olfatoria lateral y constituyen la corteza olfatoria primaria.

La corteza prepiriforme proyecta sus fibras a la corteza entorrinal y a los núcleos amigdalinos. Las fibras eferentes de la corteza entorrinal se dirigen a la formación del hipocampo y a la corteza insular anterior y frontal a través del

fascículo unciforme. Diferentes partes del complejo nuclear amigdalino reciben aferencias olfatorias.

La sustancia perforada anterior o tubérculo olfatorio, es una región romboidal limitada por las estrías olfatorias medial y lateral y la cintilla olfatoria. El borde posterior de esta región está formado por una banda lisa oblicua, la banda diagonal de Broca.

El área subcallosa y la circunvolución paraterminal constituyen, en conjunto, el área septal. El término área septal se refiere a la parte cortical de esta región por debajo de la cual se encuentran los núcleos septales. Los núcleos septales se encuentran próximos a la base del *septum pelucidum*. Los núcleos septales reciben aferentes desde la formación del hipocampo a través del trígono cerebral.

Las fibras eferentes que salen de los núcleos septales se proyectan a través de:

- 1) La estría medular hacia el núcleo medial de la habénula.
- 2) El fascículo prosencefálico medial hacia el hipotálamo lateral mesencefálico.
- 3) El trígono hacia la formación del hipocampo.

6.5 Comisura anterior.

Lateralmente se divide en dos partes:

- 1) Anterior u olfatoria.
- 2) Posterior.

Las fibras de la parte anterior de esta comisura cruzan y se conectan con las células del núcleo olfatorio anterior contralateral. De esta manera los bulbos olfatorios se mantienen interconectados.

Las fibras de la parte posterior de la comisura anterior conectan principalmente entre sí a las circunvoluciones temporales medias, aunque algunas pasan a la circunvolución temporal inferior [51].

7. HIPOCAMPO

7.1 Aspectos generales.

El hipocampo, es una estructura cerebral fundamental para el proceso de memoria. Es parte de la formación hipocámpica junto con el subículo y la circonvolución dentada.

El recuerdo de nuevos hechos y eventos, lo que se conoce como memoria declarativa, se produce a partir de modificaciones sinápticas dentro del hipocampo. También es necesaria la integridad del circuito de Papez cuando menos en un hemisferio [52].

7.2 Anatomía.

En una sección coronal, el hipocampo tiene forma de "C"; como su perfil tiene cierto parecido con los cuernos de un carnero, también se le llama asta de Amón. La superficie ventricular del hipocampo es una delgada capa de sustancia blanca llamada *alveus* que está formada por axones que entran y salen de la formación hipocámpica [52].

Longitudinalmente, el hipocampo comprende tres estructuras bien diferenciadas: El giro dentado, el hipocampo dorsal o asta de Amón y el subículo. La parte anterior está curvada dorsalmente formando el uncus del hipocampo. En la parte superior se sitúa un gran fascículo de fibras, la fimbria.

En la parte posterior, ambos se separan y la fimbria constituye el fórnix, que se arquea hacia delante por debajo del cuerpo calloso.

Es un corte frontal del hipocampo que presenta una apariencia de pliegue en forma de "S" o caballito de mar, de donde deriva su nombre (*Hippocampus* = caballo de mar) [52].

El hipocampo dorsal se divide en cuatro zonas o regiones en función del tamaño de sus neuronas y la disposición de éstas, según anchura y densidad: Región CA1, formada por pequeñas células piramidales; región CA2, área estrecha con gran cantidad de células piramidales grandes; región CA3, con una anchura superior a la anterior, contiene grandes células piramidales pero en menor densidad; y, región CA4, zona terminal con células piramidales grandes. Esta parte está rodeada por la circunvolución dentada [52].

7.3 Conexiones eferentes.

La mayor parte de las eferencias del hipocampo salen de éste, constituyendo la fimbria y el fórnix posteriormente. El fórnix se divide en dos porciones, una que se encuentra por delante de la comisura blanca anterior (porción precomisural) y otra por la parte posterior (porción postcomisural). El hipocampo dorsal envía fibras hacia el núcleo lateral del *septum* por el fórnix precomisural, por donde también se encuentran fibras procedentes del *subiculum* y que se dirigen hacia el hipocampo precomisural, al núcleo olfatorio anterior, a la corteza frontal y al propio núcleo lateral del *septum*.

La región postcomisural del fórnix lleva fibras procedentes del *subiculum* hacia el complejo mamilar y, también al núcleo anterior del

tálamo, al núcleo ventromedial del hipotálamo. Por último, el *subiculum* envía fibras a la corteza entorrinal, a la corteza temporal medial y a la amígdala [52].

7.4 Conexiones aferentes.

Las aferencias más importantes que recibe el hipocampo proceden de la corteza entorrinal y se dirigen al giro dentado y al hipocampo dorsal. Otro grupo de fibras procedente del cuerpo calloso discurren por el cíngulo y, junto con fibras procedentes de la amígdala, se dirigen en su mayor parte al *subiculum*. El núcleo medial del *septum* envía eferencias al hipocampo dorsal y al *subiculum* a través del fórnix por donde también discurren las procedentes del hipocampo y la corteza entorrinal del hemisferio contralateral. Por último, también recibe aferencias del hipotálamo, en particular, del núcleo supramamilar [52].

7.5 Hipocampo y memoria.

Se ha descrito en diferentes modelos la dependencia de la memoria con el hipocampo, y se ha establecido la relación del LPT con procesos de memoria y aprendizaje [53,54,55].

Gaffan (1972), afirmaba que una lesión en el hipocampo alteraría la memoria de reconocimiento; es decir, la encargada de obtener información acerca de estímulos novedosos [55,56]. Existe una relación entre el hipocampo y el sistema límbico; Kornhuber (1973) menciona que el sistema límbico es el encargado de seleccionar la Información que va a ser

almacenada en la memoria a largo plazo. La destrucción del hipocampo provocaría la incapacidad funcional para este almacenamiento de largo plazo [53]. Los criterios por los cuales una información sería seleccionada para su almacenaje estarían determinados por un sistema motivacional integrado en el sistema límbico y del cual formaría parte el hipotálamo; este sistema sería el que llevara la información al hipocampo y éste entonces procedería a su almacenamiento. Hirsh (1974) plantea la capacidad de recuperación de información, ya que ubica al hipocampo en un sistema funcional encargado de determinar la información que se va a recuperar, la memoria [54].

Walker y Olton (1979) realizaron experimentos utilizando un laberinto con brazos en disposición radial. El objetivo era evaluar la función del hipocampo en relación con dos tipos de memoria. Por un lado, la memoria de referencia, donde se almacena la información relativa a aspectos constantes o permanentes del animal, y de otro tipo, llamada memoria operativa o de trabajo, la cual refiere información procedente de situaciones concretas y actuales temporales, un tipo de memoria a corto plazo que requiere asociaciones flexibles estímulo-respuesta y que es muy sensible a las interferencias [55].

El planteamiento de estos autores es que, una lesión en el hipocampo produciría una alteración de la memoria de trabajo pero no de la de referencia. El hipocampo procesaría de manera diferente, en función del

tipo de memoria que se requiera en cada situación, interviniendo cuando se requiere la memoria operativa únicamente y no haciéndolo cuando se requiere la memoria de referencia [56]. Estos autores proponen que el hipocampo interviene en comportamientos en los que es necesaria la memoria operativa, sin importar que la tarea sea de tipo espacial o no.

Como ya se mencionó en párrafos anteriores, el deterioro en la capacidad olfativa es un signo que se observa en pacientes que cursan alguna enfermedad neurodegenerativa asociada a demencia y por tanto a alteraciones de la memoria, como por ejemplo enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Parkinson, entre otras [57]. Aunque el déficit olfativo se puede observar desde las etapas iniciales de la EA, es el déficit cognitivo, uno de los signos más ampliamente estudiados ya que es patognomónico de las enfermedades neurodegenerativas que cursan con demencia. Ha quedado clara la relación entre la presencia de alteraciones en el olfato y el deterioro cognitivo [57]; sin embargo, el mecanismo por el cual se relacionan ambos signos no está claro aún, y debido a que el diagnóstico de certeza de algunas enfermedades como, por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer, se realiza solamente *postmortem*, se hace necesario el implementar un modelo animal para el estudio de esta relación.

8. OLFATO Y MEMORIA

Desde la década de los ochenta se ha observado una relación entre la disminución de la capacidad olfativa y un deterioro de la memoria. Existen varios estudios que reportan un declive en la capacidad olfativa y el desarrollo posterior de alguna enfermedad neurodegenerativa, la cual puede ir desde un deterioro cognitivo leve, hasta enfermedades neurodegenerativas que cursan o no con demencia, como la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esquizofrenia, enfermedad de Huntington, etc. [57].

Ahora bien cabe preguntarse ¿Cuál es la relación entre la memoria y el olfato?

Una enfermedad neurodegenerativa, que cursa con demencia y por ende con déficit de memoria, es la EA. Dicha enfermedad es crónica, progresiva, irreversible y propia del ser humano; clínicamente se caracteriza por deterioro progresivo de la memoria de corto plazo, incapacidad para reconocer personas, objetos y realizar acciones habituales como vestirse, abrir puertas, etc. [19]. Este deterioro es progresivo hasta que la persona que la padece llega a ser totalmente dependiente de otra (cuidador primario) para realizar todas las actividades de la vida diaria; finalmente la enfermedad es incapacitante y conduce inevitablemente a la muerte del paciente. Esta enfermedad, como hemos mencionado anteriormente,

curso con deterioro olfativo previo a la manifestación clínica del deterioro cognitivo.

El por qué la memoria y el deterioro de procesos cognitivos en esta enfermedad se encuentran relacionados aún no es esclarecido totalmente. En autopsias de personas que en vida padecieron la enfermedad de Alzheimer, se han encontrado las lesiones típicas de la enfermedad (placas neuríticas, marañas intraneuronales de Tau y microglía activada) en el bulbo olfatorio, lo cual pudiera contribuir al deterioro olfativo [58].

9. BETA AMILOIDE 25-35.

Existe evidencia que la fracción 25-35 del beta amiloide es la fracción capaz de generar especies reactivas de oxígeno, y por tanto, se le ha denominado como la fracción neurotóxica [59, 60].

Péptido B Amiloide y Disfunción Sináptica.

El péptido β -A puede afectar la función sináptica y, por ende, el procesamiento cognitivo antes del proceso de degeneración misma [61].

El β -A 25-35 inhibe la transmisión sináptica aferente de la amígdala basolateral, un proceso mediado por los canales de calcio presinápticos [62]. Hay evidencia de que diferentes formas solubles del péptido β -A, entre ellos el β -A (1-42) y sus fragmentos β -A (25-35, 1-40), pueden inhibir la inducción de LTP en el hipocampo de roedores [63]. Este efecto es dependiente de los receptores de glutamato tipo NMDA [64]. Con la información presentada en los capítulos anteriores hemos formulado la siguiente hipótesis.

9.1 Hipótesis.

La inyección de β -A en hipocampo de la rata provocará un deterioro en la memoria olfatoria y espacial, además de neurodegeneración en la zona de inyección; esta degeneración neuronal disminuirá y la conducta olfatoria se preservará previa la administración de 17 beta estradiol.

9.2 Objetivo general.

Establecer la relación que existe entre el daño neuronal, producido por la inyección de β -A en hipocampo vs. el bulbo olfatorio, el deterioro de la memoria olfatoria y espacial, así como el daño neuronal secundario a la inyección del β -A en cualquiera de las dos estructuras.

9.3 Objetivos específicos.

- Estudiar el efecto que produce la inyección *in situ* del β -A en la región CA1 del hipocampo de la rata sobre la conducta olfatoria y espacial, así como el daño neuronal secundario a la inyección.
- Estudiar el efecto que produce la inyección *in situ* del β -A en el bulbo olfatorio de la rata sobre la conducta olfatoria y espacial, así como el daño neuronal secundario a la inyección.
- Estudiar el efecto neuroprotector del 17 β -estradiol posterior a la inyección β -A en cualquiera de las dos estructuras.

10. DISEÑO EXPERIMENTAL

10.1 Justificación.

En modelos animales se ha estudiado el daño a la memoria espacial producido por la inyección de β -A; sin embargo, no se ha evaluado el deterioro olfatorio en estos modelos, ni el daño neuronal producido en las estructuras que participan en la integración de la conducta olfatoria. En este proyecto, mediante la inyección de β -A en hipocampo, se pretende estudiar tanto el deterioro olfativo como su relación con la neurodegeneración en dichas estructuras, así como la neuroprotección obtenida mediante la administración de 17- β estradiol.

10.2 Material y métodos.

Se utilizaron ratas hembras Wistar adultas. Los animales fueron colocados en jaulas (4-5 por jaula) con alimento y agua *ad libitum* y con un régimen artificial de 12 h luz/oscuridad (periodo de luz de 7 AM a 7 PM). Todos los experimentos y las condiciones de cuidado del animal fueron aprobados por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina en la Universidad Nacional Autónoma de México y conforme a la Directiva del Consejo de las Comunidades Europeas. Todos los esfuerzos fueron hechos para minimizar el número y sufrimiento de los animales utilizados.

Un total de 162 ratas hembras Wistar vírgenes de tres meses de edad del bioterio de la Facultad de Medicina de la UNAM fueron utilizadas como sujetos y otros 63 (20-22 días de edad) animales jóvenes fueron utilizados

como “estímulo” en la prueba de reconocimiento social. Las ratas adultas pesaron $248.42 \text{ g} \pm 12.6 \text{ g}$ y las jóvenes $112 \pm 6.48 \text{ g}$. Las ratas adultas fueron ovariectomizadas bajo anestesia general (mezcla de ketamina/xylazina, $15 \text{ mg/kg} + 1 \text{ mg/kg}$, i.p) 15 días antes del procedimiento experimental. Para poder minimizar el número de animales jóvenes utilizados, fueron rotadas en los grupos control y experimental. Los animales fueron individualmente enjaulados durante intervalos de exposición de 60 minutos. Todos los experimentos fueron conducidos durante la fase de luz del ciclo, entre 0700 h y 1300 h.

10.2.a Inyección de β -A.

Cirugía estereotáxica: Todas las ratas hembras adultas Wistar fueron anestesiadas con la mezcla mencionada de ketamina/xylazina y cirugía estereotáxica fue llevada a cabo en un aparato estereotáxico estándar para roedores (David Kopf, USA). Los animales fueron divididos en seis grupos control y doce experimentales ($n=9$ animales por grupo) para la cirugía estereotáxica. Tres grupos control fueron asignados para inyección bilateral de solución buffer fosfato en HIPP y tres más para el BO, probando a 24 h, 8 y 15 días después de la inyección para evaluar la conducta de reconocimiento social. Tres grupos experimentales fueron inyectados con $2 \mu\text{l}$ de $A\text{-}\beta_{25-35}$ ($1 \mu\text{g}/100 \mu\text{M}$) disuelto en bufer fosfato y previamente incubado a 37°C en agitación constante durante 72 h (para inducir estado de agregación) en el HIPP. Se evaluó la conducta social y se recolectó el

tejido cerebral de los animales experimentales a las 24 h, 8 o 15 días después de la inyección de β -A₂₅₋₃₅. Otros tres grupos adicionales fueron inyectados antes y después de la administración de β -A₂₅₋₃₅ con 17- β estradiol (E₂) 25 μ g/kg s.c. durante dos semanas, una o dos semanas adicionales y utilizando propilenglicol como vehículo.

Como control para las inyecciones de E₂, tres grupos adicionales recibieron inyecciones diarias solo con el vehículo (propilenglicol subcutáneo) durante dos semanas y más tarde durante una o dos semanas (igualmente a la descripción del párrafo anterior para las inyecciones de E₂) (Ver Figura 1). Las coordenadas para aplicar la inyección en el HIPP tanto de β -A₂₅₋₃₅ como para las inyecciones control, se realizaron siguiendo el atlas estereotáxico de Paxinos: 4.2 mm posteriores a Bregma, 3.0 mm lateral desde la línea central y 2.6 mm ventral a duramadre. Otros seis grupos experimentales recibieron una inyección bilateral del β -A en el BO, utilizando las siguientes coordenadas: 7.1 mm rostral a bregma, 1.5 mm lateral a línea central, y 1.5 mm ventral a duramadre. Tres de estos grupos también recibieron E₂ durante dos semanas y una o dos semanas después, anteriores a la inyección de β -A₂₅₋₃₅ y evaluados 24 h, 8 o 15 días después (igual que en los grupos HIPP); otros grupos recibieron inyecciones del vehículo durante dos semanas y una o dos semanas después, una inyección de β -A₂₅₋₃₅. Después de la recuperación de la cirugía, los animales fueron colocados en sus jaulas individuales. Después de terminar la prueba de conducta social,

los animales fueron sacrificados por decapitación y sus cerebros fueron removidos y almacenados a -80°C para análisis subsecuente.

10.2.b Prueba de memoria de reconocimiento social.

El procedimiento de reconocimiento social fue similar al descrito en nuestros artículos anteriores [8, 65]. El protocolo utilizado brevemente se describe a continuación: empezando dos días antes de la inyección de $\beta\text{-A}_{25-35}$ o del vehículo en HIPP o BO y justo antes de la prueba de reconocimiento social, cada rata adulta se colocaba en la jaula de prueba, que consistía en una jaula de acrílico con medidas de $50 \times 50 \times 42$ cm, durante cuatro minutos diariamente, para habituarlas. Cada sesión de prueba consistía en una secuencia de tres eventos con duración de cuatro minutos cada uno. La primera prueba para la rata adulta fue el periodo de habituación a la jaula; la segunda fue el primer encuentro entre la rata adulta y la juvenil (hembra) (a la que llamaremos "familiar" = adquisición de memoria social); la tercera fue una reexposición al animal juvenil previamente colocado en la jaula de prueba "familiar" junto con otra rata juvenil desconocida (a la que llamaremos "no familiar") como estímulo introducida al mismo tiempo a la jaula 60 minutos (intervalo inter exposición IIE) después de la prueba de adquisición de memoria social. Los grupos experimentales fueron evaluados 24 h, 8 y 15 días después de la inyección de $\beta\text{-A}_{25-35}$ en el HIPP o en el BO con o sin tratamiento de E_2 . Después de cada prueba, la jaula fue limpiada cuidadosamente. La grabación en video de la conducta investigativa fue

utilizada para evaluar el tiempo invertido por las ratas adultas para investigar al animal juvenil familiar o no familiar en la prueba de reconocimiento social. La información recolectada de las grabaciones de video fue transferida a una computadora Hewlett Packard para su análisis ulterior. Las conductas consideradas relacionadas con el aprendizaje y memoria de reconocimiento social fueron olfatear, persecución cercana, y tocar con las patas al animal estímulo familiar o no familiar. El porcentaje de tiempo investigando al familiar comparado con el tiempo investigado al no familiar fue cuantificado. Primero: Si se encontraba una reducción importante en la duración del tiempo promedio de exploración entre los dos primeros encuentros con la rata estímulo; y segundo: Si se observaba un tiempo de investigación significativamente mayor a la rata no familiar en la tercera prueba comparada con la familiar, se consideraba como una memoria selectiva de reconocimiento.

10.2.c Pruebas de percepción olfatoria y habituación.

Para probar posibles alteraciones en la percepción olfatoria general, las ratas ovariectomizadas fueron utilizados ($n=9/\text{grupo}$); para ambas inyecciones, HIPP y BO, un grupo fue inyectado con sólo el vehículo y probado después de 24 h; otros grupos fueron inyectados con $\beta\text{-A}_{25-35}$ y probados 24 h, 8 y 15 días después (grupos independientes). Otro grupo tratado previamente con E_2 durante dos semanas anteriores a la inyección de $\beta\text{-A}$ (grupo $\beta\text{-A}_{25-35} + E_2, 24 \text{ h}$). Dos grupos adicionales fueron inyectados

adicionalmente con E₂ durante una o dos semanas después de la inyección de β -A₂₅₋₃₅ (grupos β -A₂₅₋₃₅ + E₂, 8 días y β -A₂₅₋₃₅ + E₂, 15 días). Para la prueba de percepción olfatoria, los animales fueron temporalmente transferidos en forma individual de su jaula hogar a otra caja de características similares. Mientras el animal permanecía en esta otra jaula, el experimentado colocaba en el centro de la jaula hogar una pequeña pieza de chocolate, la cual era enterrada en una esquina al azar entre el aserrín. Una vez realizada esta maniobra, el animal era regresado a su jaula hogar para la evaluación de la percepción olfatoria; cada animal fue probado solamente una vez. El tiempo que tomó localizar y comer el chocolate fue grabado (latencia hasta un máximo de 120 s). La latencia para localizar la pieza de chocolate enterrada fue la variable dependiente en este análisis. Si pasados los 120 s, el animal no localizaba la pieza de chocolate enterrada, se consideraba que había ocurrido una alteración de la función olfatoria.

Después de que la prueba de reconocimiento social era completada, evaluamos las habilidades de discriminación olfatoria no social en todos los grupos (adaptada de Paolini y McKenzie) [66]. Un papel filtro impregnado con esencia de limón fue introducido dentro de un tubo de vidrio pequeño perforado (5 cm de largo, 1.5 cm de diámetro) el cual fue fijado en una de las paredes de la jaula experimental y se le permitió al animal explorarla durante dos minutos. Repetimos este procedimiento tres veces con diez minutos de intervalos entre las pruebas (IIE) y con la misma

esencia (limón) (tres pruebas de habituación). En la cuarta prueba de discriminación, una esencia de vainilla fue depositada en el mismo papel filtro que tenía previamente la esencia de limón y el procedimiento fue repetido como se describió previamente. Para probar la preferencia de olor, también utilizamos otras esencias como el café y la naranja. No observamos preferencia o aversión alguna a estos olores (datos no mostrados) y decidimos probar solamente con las esencias de limón y vainilla.

10.2.d Prueba de conducta de alternancia espontánea en laberinto en “T”.

La prueba de laberinto en T ha sido ampliamente utilizada para evaluar la memoria espacial en las ratas. Esta prueba analiza la conducta natural espontánea de roedores y otras especies [67,68]. Utilizamos esta prueba para evaluar los efectos de la inyección de β -A₂₅₋₃₅ en el HIPP. Los mismos grupos control y experimental que fueron probados en la memoria de reconocimiento social detallada anteriormente fueron utilizados para evaluar los efectos sobre memoria espacial. El laberinto en T fue hecho en madera pintada de negro y cubierta por Plexiglas transparente. Cada brazo se hizo de 30 cm de largo, 12 cm de ancho y 10 cm de altura. El piso de cada brazo fue cubierto con papel, el cual fue cambiado entre pruebas. Cada rata fue colocada al final de uno de los brazos y se le permitió moverse libremente en el laberinto por ocho minutos. El número de entradas hechas por los animales en cada brazo, incluyendo retornos al mismo brazo (errores)

fueron grabadas. La alternancia fue definida como entradas dentro de los tres brazos en ocasiones consecutivas (tripletes).

10.2.e Medición de lipoperoxidación (LPO).

Después de las pruebas de conducta, los animales control y experimentales fueron sacrificados, sus cerebros fueron colocados sobre placas de vidrio sobre hielo; el HIPP, BO y la corteza frontal fueron disecadas y pesadas inmediatamente después. Cada estructura fue homogenizada con PBS 1:20 y dividida en dos tubos los cuales fueron almacenados a -80°C hasta el día del ensayo para LPO utilizando un Kit comercial o para realizar Western blot. LPO se midió utilizando el kit Peroxidetect (Sigma-Aldrich) el cual mide el aducto formado por el naranja xylenol y Fe_3^+ generado en presencia de peróxidos en el tejido. Los lípidos de la muestra fueron extraídos utilizando el protocolo Bligt & Dyer. Por cada mililitro de muestra, 3.75 ml 1:2 (v/v) de CHCl_3 : MeOH fue agregado y mezclado. En un segundo paso, 1.25 ml de CHCl_3 se agregó y mezcló para posteriormente agregar 1.25 ml de dH_2O . Las muestras fueron centrifugadas a 1000 RPM durante cinco minutos a temperatura ambiente para obtener un sistema de dos fases y del cual la fase orgánica fue recuperada. Se colocaron 100 μl de la muestra en un tubo; 1 ml del colorante preparado del kit fue agregado. La mezcla se incubó durante 30 minutos a 25°C : las muestras fueron leídas en un espectrofotómetro a 560 nm utilizando metanol como blanco. Una curva

estándar de t-BuOOH fue realizada. Se calcularon nanomoles de peróxido utilizando la curva estándar y de acuerdo con la fórmula:

$$\text{Valor LPO en nmol/ml} = (\text{Es}-\text{Eb}) \times 50.0 / (\text{Estd})$$

X (volumen muestra) (Es = muestra de absorbencia, estándar = absorbencia de 1 nmol/peróxido de curva estándar, Eb = blanco absorbencia).

10.2.f Western blot para 4-Hydroxinonal.

Se realizó la técnica de Western blot para cuantificar aductos de 4-hydroxinonal (4-HNE). Las proteínas fueron separadas mediante electroforesis por gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 10%) y transferidas a membranas de nitrocelulosas. Las membranas se recolectaron y secaron a temperatura ambiente hasta su uso. Las membranas conteniendo las muestras (BO o HIPP) fueron bloqueadas con 5% de leche descremada en TBS-T = 0.01% de Tween 20 (TBS-T) por dos horas a 37°C, e incubadas con anti 4-HNE (Sistemas R&D) (1:1000) durante la noche en agitación suave a 4°C. Las membranas fueron enjuagadas tres veces con TBS-T, y posteriormente se incubaron con IgG cabra anti-conejo conjugado con peroxidasa rábano (1:10,000) (Sta. Cruz) por una hora seguida de tres enjuagues con TBS-T. Las bandas fueron visualizadas por quemiluminiscencia (ECL, General Electric).

10.2.g Tinción con fluorojade.

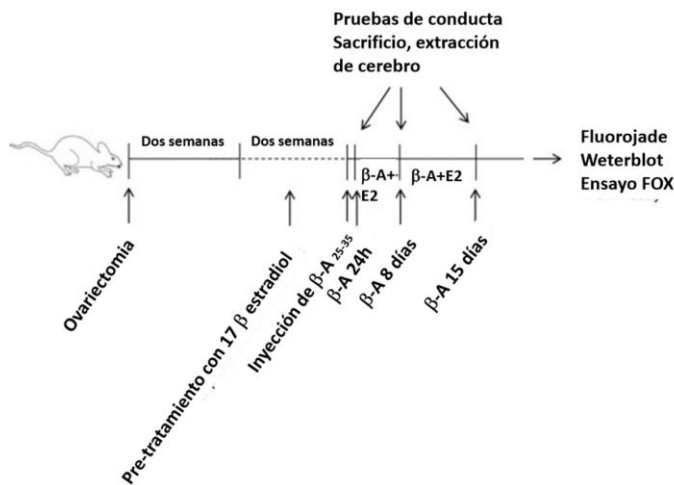
Las neuronas en degeneración de HIPP y BO, posteriores a la administración del β -A₂₅₋₃₅, fueron marcadas utilizando la tinción de Fluoro-Jade. Todas las

neuronas marcadas del hipocampo dorsal fueron contabilizadas. Cuatro secciones de cada cerebro fueron utilizadas para el análisis estadístico. A continuación describimos brevemente la técnica: los cerebros fueron sumergidos en parafina, cortados en secciones de 7 μm de grueso utilizando un micrótopo y posteriormente fueron montados en portaobjetos de cristal y sumergidos en una solución que contenía 1% de hidróxido de sodio en 80% de alcohol (230 mL de 5% de Na OH fueron agregados a 80 ml de alcohol absoluto) durante cinco minutos.

Esto fue seguido de dos minutos en 70% de alcohol y dos minutos más en agua destilada. Los portaobjetos fueron entonces transferidos a una solución de 0.06% de permanganato de potasio por diez minutos. Posteriormente fueron enjuagados en agua destilada por dos minutos. La solución de la tinción fue preparada de una solución stock de Fluoro-Jade C de 0.01% que fue hecha agregando 10 mg de polvo de colorante de 100 mL de agua destilada. Para obtener 100 mL de solución de la tinción, 4 mL de la solución stock fue agregada a 96 mL de 0.1% de vehículo de ácido acético. Después de 20 minutos en la tinción, los portaobjetos fueron enjuagados durante un minuto en cada una de las sesiones de lavado con agua destilada. El exceso de agua fue removido brevemente (15s) colocando los portaobjetos verticalmente sobre una toalla de papel. Los portaobjetos fueron puestos a 50°C hasta que se secaron completamente. Los portaobjetos secos fueron limpiados por inmersión en xileno un minuto

antes de su análisis. Para analizarlos, el promedio del número de células marcadas fue contabilizado en cuatro secciones de HIPP y BO de cada animal y las secciones fueron tomadas de las coordenadas antes mencionadas.

Figura 1. Esquema de la línea de tiempo del procedimiento usado.



Todas las ratas adultas fueron ovariectomizadas y se mantuvieron en recuperación por dos semanas antes de la realización de cualquier procedimiento. Se asignaron las ratas a los grupos experimentales a quienes se les inyectó 17 β estradiol por dos semanas, las inyecciones de β -A₂₅₋₃₅ se realizaron a las 24 hr., 8 y 15 días.

11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La información de la conducta desarrollada por los animales controles y experimentales obtenida durante la tarea de reconocimiento social fue expresada como ratios (razón) ((tiempos de investigación de un no familiar/(no familiar + familiar)). Debido a que los ratios violan la homogeneidad de la varianza requerida para la realización de estadística paramétrica, los ratios de investigación social fueron previamente

transformados mediante el arco seno para su análisis ($\arcsin(\sqrt{\text{ratio}})$) [69]. Los tiempos de investigación social fueron grabados para cada animal y luego estos valores fueron promediados y transformados de acuerdo con el grupo experimental. Para evaluar un efecto generalizado del tratamiento (inyección β -A₂₅₋₃₅) en el tiempo de exploración, una prueba de análisis de varianza (ANOVA) fue llevado a cabo con cada una de las regiones cerebrales del hipocampo o bulbo olfatorio. El tratamiento y duración de éste como factores, alcanzando una diferencia significativa de $p < 0.05$; *post hoc* (corregido para comparaciones múltiples Tukey Test) fueron hechas utilizando un SPSS 15.0.

Los efectos de la inyección del β -A₂₅₋₃₅ sobre la discriminación olfatoria de diferentes esencias fueron analizados utilizando una ANOVA de 4 vías: región cerebral (HIPPO/BO), tratamiento (vehículo, β -A₂₅₋₃₅, E₂) duración de tratamiento (24 h, 8 y 15 días) y pruebas de olor como factores y seguidos de pruebas *post-hoc*. Los efectos de β -A₂₅₋₃₅ sobre las latencias para localizar el chocolate enterrado, LPO y tinción de Fluoro-Jade también fueron analizados utilizando ANOVA de dos y tres vías. Los resultados mostraron una diferencia estadística significativa de $p < 0.05$ seguido de pruebas *post-hoc* de Tukey.

12. RESULTADOS

La inyección de β -A₂₅₋₃₅ en la región CA1 de hipocampo altera la conducta olfatoria de reconocimiento social.

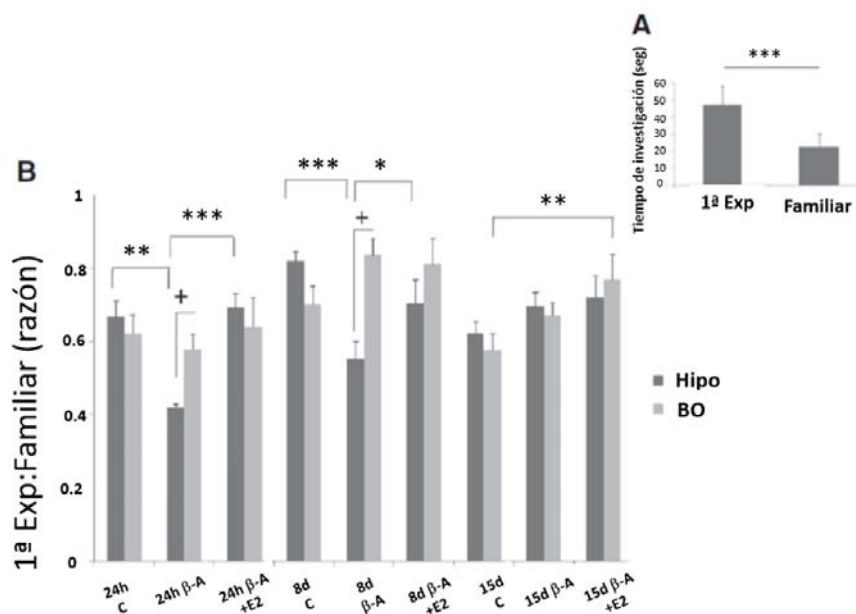
Se observó un aumento en el tiempo de exploración en la exposición a la rata familiar, en los individuos inyectados con β -A₂₅₋₃₅ comparado con el del grupo control. En los grupos evaluados a las 24h y a los 8 días, la rata es incapaz de distinguir entre una rata familiar y una no familiar. El grupo tratado con 17 β -estradiol presenta tiempos de exploración similares al grupo control; no se observó ningún efecto cuando se inyectó el péptido directamente en el bulbo olfatorio.

Se realizó una ANOVA de tres vías en donde se pudo observar un efecto entre los tratamientos (Vehículo, β -A₂₅₋₃₅ y la administración de estrógenos) ($p < 0.004$); también se observaron diferencias en la duración del tratamiento 24hr, 8 y 15 días. Los resultados muestran que los efectos de la inyección de β -A₂₅₋₃₅ ocurren cuando éste se inyecta en hipocampo y no cuando se inyecta en el bulbo olfatorio. Los resultados muestran que la memoria olfatoria de reconocimiento social se ve afectada cuando se administra β -A₂₅₋₃₅ en el hipocampo y es evaluada a las 24 horas y 8 días posterior a la inyección. Comparada con el grupo control, no se observó ninguna diferencia entre los grupos experimental y control a los 15 días, $p > 0.073$ NS. La administración de 17 β -estradiol mejoró significativamente la

memoria de reconocimiento social en los grupos de 24h y 8 días comparados con la del grupo control $p < 0.001$.

La única diferencia significativa, en el grupo inyectado en bulbo olfatorio, fue una mejora en la memoria de reconocimiento social, en el grupo al que se le administró 17β -estradiol comparado con la del grupo control (vehículo); esto podría interpretarse como una mejora en la memoria secundaria a la administración de estrógenos.

Figura 2. Reconocimiento social

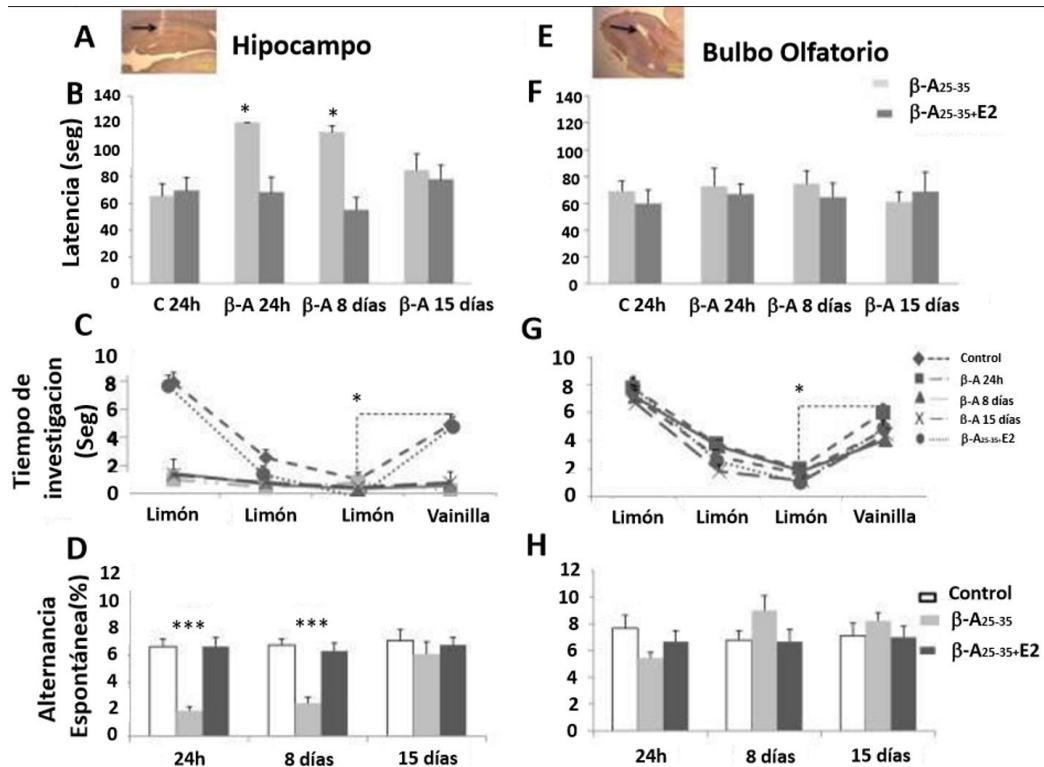


Memoria de reconocimiento social. (B). Tiempo de investigación hacia la rata juvenil, familiar o no familiar. La rata adulta ovariectomizada fue evaluada con un tiempo inter exposición de 60 minutos. Se observa un deterioro en la memoria de reconocimiento social en los grupos inyectados con β -A₂₅₋₃₅ en hipocampo, a las 24h y a los 8 días. No se observa deterioro en los grupos inyectados en bulbo olfatorio; de hecho se muestra una mejoría en la memoria olfatoria en los grupos evaluados a los 15 días.

La figura 3 muestra los resultados de la prueba de localización. Se muestra el tiempo de latencia de localización del chocolate enterrado en la cama de aserrín entre los grupos control, los inyectados con β -A₂₅₋₃₅ y con el grupo

tratado con estrógenos. La ANOVA de tres vías mostró diferencias dependiendo del tratamiento (vehículo/ β -A₂₅₋₃₅), de la duración del tratamiento (24h, 8 y 15 días) y de la región cerebral (hipocampo, bulbo olfatorio).

Figura 3. Prueba de localización, discriminación y laberinto en T.



Se observa un aumento de latencia para encontrar el trozo de chocolate, en los grupos inyectados en hipocampo. Esta latencia se reduce en los grupos tratados con 17 β estradiol y en los grupos inyectados en bulbo olfatorio. Se observa un deterioro en la prueba de discriminación, en los grupos inyectados con B-A en hipocampo así como un deterioro en la memoria espacial la cual no se observa en los grupos

Los resultados de la prueba de localización (Fig. 3 B y F) muestran un incremento en la latencia, en los grupos evaluados a las 24 h y a los 8 días, inyectados con β -A, en hipocampo, comparado con el del grupo control (vehículo) y con los que recibieron tratamiento con estrógenos. No hubo

diferencia entre los tres tiempos evaluados 24h, 8 y 15 días; ningún grupo fue capaz de encontrar el chocolate enterrado en los 120 segundos de la prueba. En contraste, los grupos control y los tratados con estrógenos fueron capaces de hacerlo en todos los tiempos evaluados posterior a la inyección de β -A.

No se encontraron diferencias entre los grupos inyectados con β -A en bulbo olfatorio.

Las figuras 3 C y G muestran los resultados de la prueba de habituación- deshabituación.

Se realizó una ANOVA de 4 vías tomando en cuenta, la duración del tratamiento, ensayos y la región cerebral inyectada como factores. Los resultados muestran (Fig. 3 C y G) diferencias significativas entre los tratamientos $p < 0.001$, entre los ensayos $p < 0.001$, y entre las regiones $p < 0.001$, pero no entre la duración del tratamiento $p > 0.05$ NS.

Estos resultados muestran (Fig. 3 C y G), que el β -A tiene efecto solo cuando es administrado en el hipocampo y no en el bulbo olfatorio.

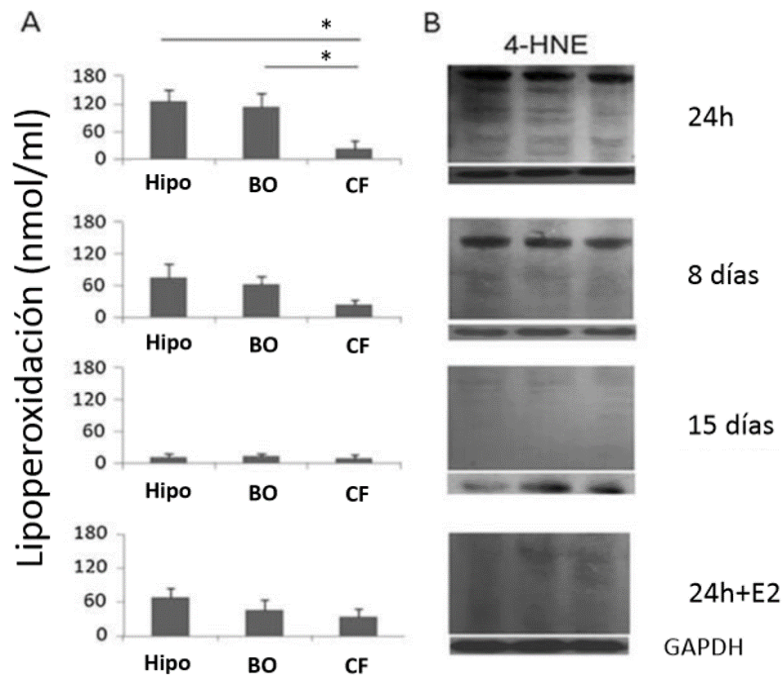
Es clara la habituación a la esencia de limón en los grupos control inyectados tanto en bulbo olfatorio como en hipocampo. Y también se observa una clara identificación de la esencia de vainilla en el ensayo número 4. En las figuras 3 C y G no se observó diferencia significativa en la habituación en ningún caso en el grupo inyectado en hipocampo con β -A. No hubo diferencia significativa entre el grupo tratado con estrógenos y el

grupo control, mientras que si las hubo en los grupos experimentales en los tiempos evaluados (Fig. 3 C y G).

La figura 3 (D y H) muestra el efecto de la inyección de β -A en bulbo olfatorio o hipocampo sobre la conducta de alternancia espontánea. Se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos, ($p < 0.0001$) entre la duración del tratamiento $p < 0.005$ y entre las regiones cerebrales ($P < 0.0001$). Se observó que los efectos de la inyección son significativamente diferentes del grupo control a las 24 hrs y a los 8 días. Los datos mostraron que la inyección de β -A en hipocampo afecta la conducta de alternancia, a las 24h y a los 8 días después de la inyección, comparada con la del grupo control y también comparado con la del grupo tratado con estrógenos. No se observaron diferencias entre el grupo tratado con estrógenos y el grupo inyectado con β -A a los 15 días.

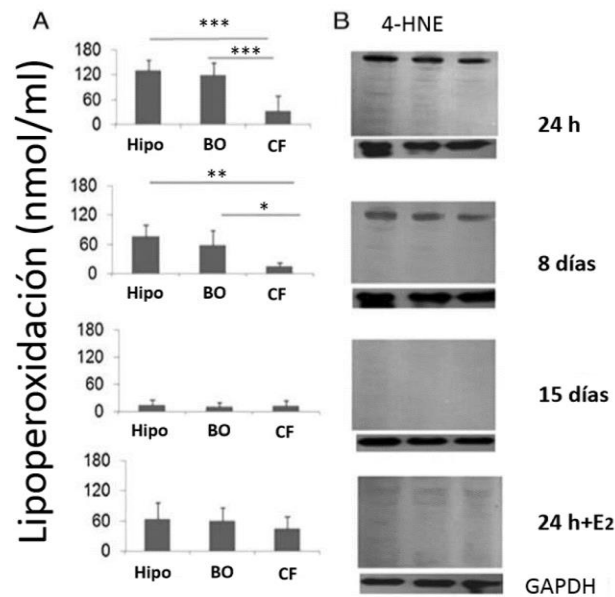
Las figuras 4 y 5 muestran los resultados de los niveles de lipoperoxidación producida posterior a la inyección de β -A₂₅₋₃₅, en bulbo olfatorio o en hipocampo. Se observa una elevación de la LPO en ambas estructuras 24 horas después de la inyección de β -A₂₅₋₃₅.

Figura 4. Niveles de lipoperoxidación en hipocampo, bulbo olfatorio y corteza prefrontal. (sitio de inyección, Hipocampo) .



Al inyectar β -A₂₅₋₃₅ en hipocampo (A) se observa un aumento del estrés oxidativo, reflejado en un aumento en la lipoperoxidación y un aumento en la generación de 4-HNE. Se puede observar el aumento en la lipoperoxidación tanto en el hipocampo como en el bulbo olfatorio, la cual disminuye hacia los 15 días. El grupo pre tratado con 17 beta estradiol mostró menor elevación de los lípidos oxidados.

Figura 5. Niveles de lipoperoxidación en hipocampo, bulbo olfatorio y corteza prefrontal. (sitio de inyección, Bulbo olfatorio) .

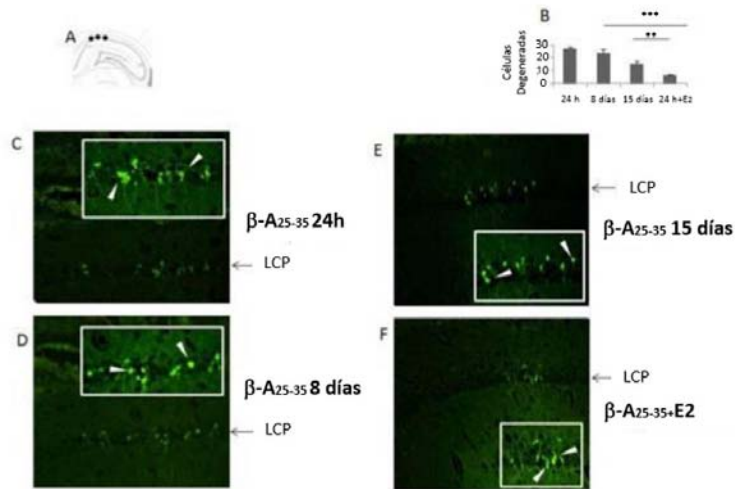


Al inyectar β -A₂₅₋₃₅ en bulbo olfatorio (A) se observa un aumento del estrés oxidativo, reflejado en un aumento en la lipoperoxidación y un aumento en la generación de 4-HNE tanto en hipocampo como en bulbo olfatorio. Se puede observar el aumento en la lipoperoxidación tanto en el hipocampo como en el bulbo olfatorio, la cual disminuye hacia los 15 días. El grupo pre tratado con 17 beta estradiol mostró menor elevación de la lipoperoxidación.

Se realizó una ANOVA de tres vías en donde se observa que la LPO producida es diferente, de acuerdo con el tratamiento, la duración del tratamiento y la región cerebral. Se observa que la inyección tiene mayor efecto en el hipocampo que en el bulbo olfatorio. Se observó que el grupo tratado con estrógenos generó niveles significativamente menores de LPO que los grupos experimentales 24 hrs después de la inyección de β -A₂₅₋₃₅ $P < 0.05$.

El Western blot para 4-HNE mostró niveles de LPO aumentados en bulbo y en hipocampo 24 hrs después de la inyección; el grupo tratado con estrógenos mostró una cantidad menor de 4-HNE que los grupos experimentales, la tinción con Fluoro-Jade, mostró la presencia de neuronas en degeneración 24 hrs, 8 y 15 días posterior a la inyección de beta amiloide en hipocampo, pero no en bulbo olfatorio. Se realizó una ANOVA de dos vías para analizar los datos, la cual mostró diferencias significativas entre los tratamientos pero no entre la duración de los mismos. Se observó una diferencia significativa a las 24 hrs entre el grupo inyectado en hipocampo con β -A₂₅₋₃₅ y el grupo tratado con estrógenos $P < 0.001$. Hubo una disminución significativa de células marcadas con Fluoro-Jade entre el grupo evaluado a los 24h y el grupo evaluado a los 15 días.

Figura 6. Micrografías de la región CA1 posterior a la inyección con B-A en.



A. Esquema de los sitios de inyección en Hipocampo. B. cantidad de células degeneradas.

C,D,E y F muestran las células positivas a tinción. Se observa una menor cantidad de células positivas en el grupo pre tratado con 17 β estradiol.

13. DISCUSIÓN

Nuestros resultados demuestran que la inyección bilateral de β -A₂₅₋₃₅ en la región CA1 de hipocampo produce un deterioro en la capacidad olfatoria de la rata. Sin embargo, la inyección de la misma dosis del péptido, en el bulbo olfatorio, no produce deterioro alguno en la conducta olfatoria. Este deterioro conductual está relacionado con el aumento en los niveles de LPO, que se ven incrementados tanto en hipocampo, como en el bulbo olfatorio. No obstante, solamente en el hipocampo se pueden apreciar neuronas en degeneración.

Los cambios conductuales ocurren principalmente a las 24 hrs y 8 días posteriores a la inyección de β -A₂₅₋₃₅. La administración de 17 β estradiol dos semanas antes de la inyección de β -A₂₅₋₃₅ previno la degeneración neuronal producida por la inyección de β -A₂₅₋₃₅; así como también evitó el deterioro en la conducta olfatoria, y disminuyó la generación de estrés oxidativo. Esto nos indica que es probable que la presencia de estrógenos juegue un papel protector contra el estrés oxidativo producido por la inyección de β -A₂₅₋₃₅.

El β -A₂₅₋₃₅ es el principal componente de las placas neuríticas que han sido relacionadas con deterioro cognitivo en pacientes de edad avanzada o con enfermedad de Alzheimer; también se sabe que los depósitos de β -A₂₅₋₃₅ son tóxicos para las neuronas. En modelos animales no se forman placas posterior a la inyección de beta amiloide, como tampoco en nuestro

modelo en los tiempos evaluados (24 hrs, 8 y 15 días). Sin embargo, sí se observan efectos neurotóxicos en el sitio de la inyección que derivan en una degeneración y muerte neuronal.

Nuestros datos muestran un deterioro tanto en la percepción olfatoria como en la memoria olfatoria de reconocimiento social después de la inyección de β -A₂₅₋₃₅. Posiblemente, el deterioro olfatorio observado se deba a una difusión del β -A₂₅₋₃₅ desde el hipocampo hacia el bulbo olfatorio. Aunque no observamos las mismas alteraciones al inyectar directamente β -A₂₅₋₃₅ en bulbo olfatorio, otra posibilidad es que dado que el hipocampo forma parte de la vía olfatoria, el deterioro observado sea consecuencia de la interrupción de esta vía, en especial en la memoria olfatoria.

Debido a que existe un déficit olfatorio en las ratas inyectadas en hipocampo, no podemos concluir que se encuentra afectada la memoria olfatoria de reconocimiento social puesto que esta memoria está basada en estímulos olfatorios. Más dado que también se presentan alteraciones de la memoria espacial, podemos concluir que la inyección de β -A₂₅₋₃₅ en hipocampo afecta tanto a la memoria espacial como a la percepción olfatoria. Esto sugiere que el deterioro olfatorio observado en los pacientes con Alzheimer puede ser secundario a una alteración en hipocampo, y no necesariamente a lesiones en el bulbo olfatorio, lo que explicaría por qué, aunque existe un déficit en la capacidad olfatoria del paciente, solo hay

evidencia de placas de beta amiloide en cerebros de pacientes en una etapa tardía de la enfermedad.

Encontramos la producción de estrés oxidativo después de inyectar β -A₂₅₋₃₅ tanto en bulbo olfatorio como en hipocampo, al medir los niveles de lipoperoxidación y la producción de 4-HNE en dichas estructuras. No obstante, encontramos que mientras en hipocampo se observa neurodegeneración como consecuencia de estrés oxidativo, en bulbo no se observó lo mismo; esto explica la preservación de la conducta olfatoria posterior a la inyección de β -A₂₅₋₃₅ en bulbo.

Se sabe que las neuronas piramidales de la región CA1 en hipocampo son muy sensibles al estrés oxidativo, [70], esto puede explicar la diferencia en la respuesta a la misma dosis de β -A₂₅₋₃₅ en ambas estructuras, así como también la diferencia en la conducta olfatoria.

Está ampliamente reportada la alteración en aprendizaje y memoria espacial posterior a la inyección bilateral de β -A₂₅₋₃₅ en hipocampo, además de que también se han observado cambios histopatológicos como degeneración neuronal y activación de la microglía.

La lipoperoxidación es un marcador de estrés oxidativo, porque se refleja el daño oxidativo en la membrana celular relacionado con especies reactivas de oxígeno, las cuales están relacionadas con muerte celular. De hecho, el estrés oxidativo está presente en diversas enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson y la enfermedad de

Alzheimer, en donde el hipocampo es uno de los primeros sitios que se ven afectados. Nuestros experimentos muestran alteraciones en la conducta y la presencia de neurodegeneración en el sitio de inyección, a las 24 hrs y 8 días posteriores a la inyección de β -A₂₅₋₃₅. Las alteraciones conductuales disminuyen y la conducta olfatoria se ve recuperada parcialmente a los 15 días posteriores a la inyección en hipocampo.

Existen reportes que indican que la región CA1 es la zona más sensible a estímulos nocivos como el estrés oxidativo, incluso su susceptibilidad es mayor comparada con la de las regiones CA2 y CA3 [71]. La diferencia de vulnerabilidad ante el estrés oxidativo explicaría el por qué ante la presencia de niveles similares de lipoperoxidación en hipocampo y en bulbo olfatorio, en el hipocampo se observa la presencia de muerte neuronal; mientras que la conducta olfatoria y las neuronas se ven preservadas cuando la inyección de β -A₂₅₋₃₅ se hace en el bulbo olfatorio.

Se sabe que la inyección de β -A₂₅₋₃₅ produce alteraciones en la memoria espacial [72]. En nuestros experimentos, efectivamente observamos alteración de la memoria espacial, en el laberinto en T además de alteraciones en la conducta olfatoria observada en los primeros días después de la inyección; sin embargo, se observa una recuperación de la conducta olfatoria en la evaluación a los 15 días. Esto puede explicarse en parte por la migración celular continua que existe entre la zona subventricular del hipocampo y el bulbo olfatorio. Además de ello, la zona

de neurodegeneración provocada por la inyección de β -A₂₅₋₃₅, se extiende a no más de 600 micrometros, por lo que las zonas adyacentes, como CA2 y CA3 permanecen intactas. Existen reportes en los cuales se ve alterada la memoria espacial, después de los 15 días de administrar β -A₂₅₋₃₅ intracerebroventricularmente (ICV). La diferencia con nuestro modelo puede explicarse debido a que la inyección ICV, genera un daño global al depositar el β -A₂₅₋₃₅ en el ventrículo lateral, lo cual permite su difusión y por tanto la producción de estrés oxidativo en distintas zonas del cerebro. La constante migración celular desde la zona subventricular hacia el bulbo olfatorio, así como la neurogénesis que se lleva a cabo dentro del bulbo mismo, pueden ser factores que contribuyan a la recuperación parcial de la conducta olfatoria posterior a los 15 días de la inyección con beta amiloide.

La neurodegeneración inducida por β -A₂₅₋₃₅ puede ser observada por medio de la tinción de Fluoro-Jade, la cual resulta positiva a las 24 hrs posteriores a la inyección de éste; tiñe neuronas en proceso de degeneración que resulta en muerte neuronal. Las neuronas degeneradas, eventualmente serán removidas junto con la astrogliosis y el proceso de inflamación provocado por la inyección.

La capacidad neuroprotectora del estradiol ha sido reportada en diversos modelos. La dosis de 17 β estradiol usada en este trabajo ha demostrado tener efectos antioxidantes en otros modelos de estrés

oxidativo como la exposición a ozono. En este estudio se observó claramente la protección contra el estrés oxidativo en las ratas a las que se les administró 17- β estradiol. En este grupo, no se observó deterioro en la conducta olfatoria en todos los intervalos de tiempo medidos posterior a la inyección de β -A₂₅₋₃₅, pero sí se observó una disminución significativa en la lipoperoxidación, lo que pone de manifiesto en este modelo la capacidad antioxidante del 17- β estradiol; esto se observa en la figura 4 en donde se aprecia que aunque existe un aumento en la LPO en el grupo con estradiol, éste es significativamente menor comparado con el de los grupos en los que solo se inyectó beta amiloide.

La dosis usada en este trabajo (25mg/kg de peso) tiene una acción antioxidante, lo que se refleja en una menor degeneración neuronal, y por lo tanto una señal más baja en la tinción con Fluoro-Jade. La disminución de la neurodegeneración se refleja en una preservación tanto de la memoria espacial, como de la conducta olfatoria.

La incidencia de Alzheimer es mayor en mujeres mayores de 65 años que en hombres lo que sugiere que los estrógenos juegan un papel importante dentro de la fisiopatología de la enfermedad

Para evidenciar el papel que juega el 17- β estradiol en la neuroprotección contra el β -A₂₅₋₃₅, en este modelo usamos ratas hembra sometidas a ovariectomía para simular las condiciones que se dan una vez

que la producción hormonal cesa, y poder determinar cuál es el papel del 17 β estradiol sin las fluctuaciones hormonales del ciclo estral.

Estudios en ratones transgénicos muestran que una baja en el nivel de estrógenos aumenta la presencia de placas de β -A. La presencia de 17- β estradiol claramente reduce los niveles de estrés oxidativo. Sin embargo, se necesitan más estudios para determinar el papel preciso que tiene el 17- β estradiol y las posibles implicaciones terapéuticas.

14. Conclusiones

Estos resultados muestran un deterioro significativo en la función olfatoria y en la memoria espacial de la rata, 24hr y 8 días después de la inyección con β -A₂₅₋₃₅ en el hipocampo, pero no así en el bulbo olfatorio.

Estas alteraciones en la función olfatoria, están correlacionados con niveles elevados de estrés oxidativo, reflejado en la elevación de la lipoperoxidación, tanto en el hipocampo como en el bulbo olfatorio, además de la presencia de neuronas degeneradas en hipocampo.

El tratamiento de dos semanas previas con 17 β estradiol, previene completamente el deterioro de la función olfatoria y de la memoria espacial, además de reducir la degeneración neuronal 24hr posterior a la inyección del beta amiloide. Estas observaciones sugieren un papel importante en la neuroprotección contra el daño inducido por el beta amiloide, lo que puede tener importancia en la implementación de un tratamiento para la enfermedad de Alzheimer, particularmente en contexto de las mujeres post menopáusicas.

Referencias

- [1] Hori Y, Matsuda O, Ichikawa S. 2014. Olfactory function in elderly people and patients with Alzheimer's disease. *Psychogeriatrics*.
- [2] Devanand DP, Lee S, Manly J, *et.al*. Olfactory deficits predict cognitive decline and Alzheimer dementia in an urban community. 2015. *Neurology* (13) 182-189.
- [3] Masurkar AV, Devanand DP. 2014. Olfactory Dysfunction in the Elderly: Basic Circuitry and Alterations with Normal Aging and Alzheimer's Disease. *Curr Geriatr Rep*. 1;3(2):91-100.
- [4] Ricardo B Maccioni , Juan P Muñoz, Luis Barbeito. 2001. The Molecular Bases of Alzheimer's Disease and Other Neurodegenerative Disorders. *Archives of Medical Research*. 32;(5): 367–381.
- [5] Takagane K, Nojima J, Mitsuhashi H. 2015. A β induces oxidative stress in senescence-accelerated (SAMP8) mice. *Biosci Biotechnol Biochem*. 23:1-7.
- [6] Ortega L, Calvillo M, Luna F, *et al*. 2014. 17-AAG improves cognitive process and increases heat shock protein response in a model lesion with A β 25-35. *Neuropeptides*. 48(4):221-232.
- [7] Jiang LF, Liao HL, Huang HM. *et al*. 2013. Potential prevention and treatment of maifanite for Alzheimer's disease based on behavior test, oxidative stress assay, and trace element analysis in hippocampus of A β (25–35)-induced AD rats. *Biol Trace Elem Res*. 152(1):50-56.
- [8] Guevara-Guzmán R, Arriaga V, Kendrick KM. *Et al* 2009. Estradiol prevents ozone-induced increases in brain lipid peroxidation and impaired social recognition memory in female rats. *Neuroscience* 31;159(3):940-50
- [9] Jamshed N, Ozair FF, Aggarwal P. 2014. Alzheimer disease in post-menopausal women: Intervene in the critical window period. *J Midlife Health*. 5(1):38-40.
- [10] Bove R, Secor E, Chibnik LB. 2014. Age at surgical menopause influences cognitive decline and Alzheimer pathology in older women. *Neurology* 21;82(3):222-9.

-
- [11] Kjelvik G, Saltvedt I, White LR. *et al.* 2014. The brain structural and cognitive basis of odor identification deficits in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. BMC Neurol. 26;14:168.
- [12] Vasavada MM, Wang J, Eslinger PJ *et al.* 2015. Olfactory Cortex Degeneration in Alzheimer's Disease and Mild Cognitive Impairment. J Alzheimers Dis. 45(3):947-58
- [13] Página oficial de la Organización Mundial de la Salud.
<http://www.who.int/about/es/>
- [14] Barber RC. 2010. Biomarkers for early detection of Alzheimer disease. J Am Osteopath Assoc. 110(8) 10-15.
- [15] Ziegler-Graham K, Brookmeyer R, Johnson E, Arrighi HM. 2008. Worldwide variation in the doubling time of Alzheimer's disease incidence rates. Alzheimers Dement;4:316-323.
- [16] Mejía-Arango S, Miguel-Jaimes A, Villa A, Ruiz-Arregui L, Gutiérrez-Robledo LM. 2007. Cognitive impairment and associated factors in older adults in Mexico. Salud Publica Mex; 49: 475-481.
- [17] Van der Flier WM, Pijnenburg YA, Fox NC, Scheltens P. 2011. Early-onset versus late-onset Alzheimer's disease: the case of the missing APOE ϵ 4 allele. Lancet Neurol. 10[3]:280-288
- [18] J.L. Barranco-Quintana, M.F. Allam, A.S Del Castillo, R. F.-C. Navajas. 2005. Factores de riesgo de la enfermedad de Alzheimer. Rev Neurol; 40 (10): 613-618.
- [19] J. Morrison (2010) Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales DSM IV. Cap.1 pp. 35-40
- [20] Almkvist O, Kadir A, Nordberg A. 2014. Degree of abnormality is associated with rate of change in measures of beta-amyloid, glucose metabolism and cognition in an autopsy-verified Alzheimer's disease case. Neurocase. 12:1-10.
- [21] Klunk WE, Engler H, Nordberg A *et al.* 2004. Imaging brain amyloid in Alzheimer's disease with Pittsburgh Compound-B. Ann Neurol. 55[3]:306-319.

-
- [22] Faull M, Ching SY, Jarmolowicz AI, *et al.* 2014. Comparison of two methods for the analysis of CSF A β and tau in the diagnosis of Alzheimer's disease. *Am J Neurodegener Dis.* 5;3[3]:143-51.
- [23] Näslund J, Haroutunian V, Mohs R, *et al.* 2000. Correlation between elevated levels of amyloid beta-peptide in the brain and cognitive decline. *JAMA.* 22-29;283(12):1571.
- [24] Fjell AM, Amlie IK, Westlye LT, *et al.* 2010. CSF biomarker pathology correlates with a medial temporo-parietal network affected by very mild to moderate Alzheimer's disease but not a fronto-striatal network affected by healthy aging. *Neuroimage.* 15;49(2):1820-1830.
- [25] Adler G, Brassens S, Jajcevic A. 2003. EEG coherence in Alzheimer's dementia. *J Neural Transm.* 110(9):1051-1058.
- [26] Fjell AM, Walhovd KB, Fennema-Notestine C. *et al.* 2010. Brain atrophy in healthy aging is related to CSF levels of A β 1-42. *Cereb Cortex.* 20(9):2069-2079.
- [27] Izzo NJ, Xu J, Zeng C, *et al.* 2014. Alzheimer's therapeutics targeting amyloid beta 1-42 oligomers II: Sigma-2/PGRMC1 receptors mediate Abeta 42 oligomer binding and synaptotoxicity. *PLoS One.* 12;9(11).
- [28] Yankner BA, Duffy LK, Kirschner DA. 1990. Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid beta protein: reversal by tachykinin neuropeptides. [Science.](#) 12;250(4978):279-282.
- [29] Kang JE, Lim MM, Bateman RJ. 2009. Amyloid-beta dynamics are regulated by orexin and the sleep-wake cycle. *Science.* 13;326(5955):
- [30] López-Toledano MA, Shelanski ML. 2004. Neurogenic effect of beta-amyloid peptide in the development of neural stem cells. *J Neurosci.* 9;24(23):5439-5444.
- [31] Giuffrida ML, Caraci F, Pignataro B. *et al.* 2009. Beta-amyloid monomers are neuroprotective. *J Neurosci.* 26;29(34)
- [32] Puzzo D, Privitera L, Leznik E. *et al.* 2008. Picomolar amyloid-beta positively modulates synaptic plasticity and memory in hippocampus. *J Neurosci.* 31;28(53):14537-14545.

[33] Wang HY, Lee DH, D'Andrea MR. *et al.* 2000. Beta-Amyloid(1-42) binds to alpha7 nicotinic acetylcholine receptor with high affinity. Implications for Alzheimer's disease pathology. *J Biol Chem.* 25;275(8):5626-5632.

[34] McKay, B. E., Placzek, A. N., & Dani, J. A. 2007. Regulation of synaptic transmission and plasticity by neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Biochemical Pharmacology.* 74, 1120–1133.

[35] Cirrito JR, Yamada KA, Finn MB. *et al.* 2005. Synaptic activity regulates interstitial fluid amyloid-beta levels in vivo. *Neuron.* 22;48(6):913-922.

[36] Hu W, He Z, Yang L. *et al.* 2014. 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) reverses beta amyloid-induced LTP deficit through blocking BAX and caspase-3 hyperactivation. *Br J Pharmacol.* En prensa.

[37] Hsieh H, Boehm J, Sato C. *et al.* 2006. AMPAR removal underlies Abeta-induced synaptic depression and dendritic spine loss. *Neuron.* 7;52(5):831-843.

[38] Gu Z, Cheng J, Zhong P. *et al.* 2014. A β selectively impairs mGluR7 modulation of NMDA signaling in basal forebrain cholinergic neurons: implication in Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 8;34(41):13614-13628.

[39] Villette V, Poindessous-Jazat F, Simon A. *et al.* 2010. Decreased rhythmic GABAergic septal activity and memory-associated theta oscillations after hippocampal amyloid-beta pathology in the rat. *J neurosci.* 18;30[33]:10991-11003.

[40] Kim MJ¹, Lee J, Seong AR, *et al.* 2011. Neuroprotective effects of *Eriobotrya japonica* against β -amyloid-induced oxidative stress and memory impairment. *Food Chem Toxicol.* 49(4):780-784.

[41] Shepherd GM. 1972. Synaptic organization of the mammalian olfactory bulb. *Physiol Rev.* 52(4):864-917.

[42] Bacon AW, Bondi MW, Salmon DP. *et al.* 1998. Very early changes in olfactory functioning due to Alzheimer's disease and the role of apolipoprotein E in olfaction. *Ann N Y Acad Sci.* 30;855:723-731.

[43] Warner MD, Peabody CA, Flattery JJ, *et al.* 1986. Olfactory deficits and Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry.* 21(1):116-118.

-
- [44] Moberg PJ, Doty RL, Mahr RN. et al. 1997. Olfactory identification in elderly schizophrenia and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. Mar-Apr;18(2):163-167.
- [45] Doty RL, Reyes PF, Gregor T. 1987. Presence of both odor identification and detection deficits in Alzheimer's disease. *Brain Res Bull*. 18(5):597-600.
- [46] Shen Q, Loewenstein DA, Potter E. et al. 2011. Volumetric and visual rating of magnetic resonance imaging scans in the diagnosis of amnesic mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. 7(4):e101-108.
- [47] Esiri MM, Wilcock GK. 1984. The olfactory bulbs in Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 47(1):56-60.
- [48] Saiz-Sanchez D, De la Rosa-Prieto C, Ubeda-Banon I. et al. 2014. Interneurons, tau and amyloid- β in the piriform cortex in Alzheimer's disease. *Brain Struct Funct* en prensa.
- [49] Daniel W, Wesson Efrat, Levy Ralph. et. al. 2010. Olfactory Dysfunction Correlates with Amyloid- β Burden in an Alzheimer's Disease Mouse Model. 13; 30(2):
- [50] Hsiao K, Chapman P, Nilsen S, Eckman C. et al. 1996. Correlative memory deficits, Abeta elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science*. 4;274(5284):99-102.
- [51] Hernando Cruz (2009) *Nervios Craneanos (tercera edición)* Editorial Prado Cap. 1 pp. 1-10
- [52] John A Kernam (2006) *El Sistema Nervioso Humano*. Editorial Mc Graw Hill. Cap. 18 pp. 299-307
- [53] H. H. Kornhuber. 1973. Neural Control of Input into Long Term Memory: Limbic System and Amnesic Syndrome in Man. *Memory and Transfer of Information*, pp 1-22.
- [54] Hirsh R. 1974. The hippocampus and contextual retrieval of information from memory: a theory. *Behav Biol*. 12(4):421-444.

-
- [55] Walker JA, Olton DS. 1979. Spatial memory deficit following fimbria-fornix lesions: independent of time for stimulus processing. *Physiol Behav.* 3(1):11-15.
- [56] Becker JT, Walker JA, Olton DS. 1980. Neuroanatomical bases of spatial memory. *Brain Res.* 3;200(2):307-320.
- [57] Barresi M, Ciurleo R, Giacoppo S. et al. 2012. Evaluation of olfactory dysfunction in neurodegenerative diseases. *J Neurol Sci.* 15;323(1-2):16-24.
- [58] Struble RG, Clark HB. 1992. Olfactory bulb lesions in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 13(4):469-473.
- [59] Tsuruma K, Tanaka Y, Shimazawa M, Hara H. 2010. Induction of amyloid precursor protein by the neurotoxic peptide, amyloid-beta 25-35, causes retinal ganglion cell death. *J Neurochem.* 113(6):1545-1554.
- [60] Zamani MR, Allen YS, Owen GP, Gray JA. 1997. Nicotine modulates the neurotoxic effect of beta-amyloid protein(25-35) in hippocampal cultures. *Neuroreport.* 20;8(2):513-517.
- [61] Marcello E, Epis R, Di Luca M. 2008. Amyloid flirting with synaptic failure: towards a comprehensive view of Alzheimer's disease pathogenesis. *Eur J Pharmacol.* 6;585(1):109-118.
- [62] Ashenafi S, Fuente A, Criado JM. 2005. Beta-Amyloid peptide25-35 depresses excitatory synaptic transmission in the rat basolateral amygdala "in vitro". *Neurobiol Aging.* 26(4):419-428.
- [63] Chen QS, Kagan BL, Hirakura Y. et al. 2000. Impairment of hippocampal long-term potentiation by Alzheimer amyloidbeta-peptides. *J Neurosci Res.* 1;60(1):65-72.
- [64] Chen QS, Wei WZ, Shimahara T. et al. 2002. Alzheimer amyloid beta-peptide inhibits the late phase of long-term potentiation through calcineurin-dependent mechanisms in the hippocampal dentate gyrus. *Neurobiol Learn Mem.* 77[3]:354-371.
- [65] Larrazolo-López A, Kendrick KM, Aburto-Arciniega M. et al. 2008. Vagino-cervical stimulation enhances social recognition memory in rats via oxytocin release in the olfactory bulb. *Neuroscience.* 152[3]:585-593.

-
- [66] Paolini AG, McKenzie JS. 1996. Lesions in the magnocellular preoptic nucleus decrease olfactory investigation in rats. *Behav Brain Res.* 81(1-2):223-231.
- [67] Dember WN, Fowler H. 1958. Spontaneous alternation behavior. *Psychol Bull.* 55(6):412-428.
- [68] Lalonde R. 2002. The neurobiological basis of spontaneous alternation. *Neurosci Biobehav Rev.* 26(1):91-104.
- [69] Clipperton-Allen AE, Lee AW, Reyes A. *et al.* 2012. E: Oxytocin, vasopressin and estrogen receptor gene expression in relation to social recognition in female mice. *Physiol Behav.* 105(4):915-924.
- [70] Wang X, Pal R, Chen XW. *et al.* 2005. High intrinsic oxidative stress may underlie selective vulnerability of the hippocampal CA1 region. *Mol Brain Res.* 140(1-2):120-126.
- [71] Wilde GJ, Pringle AK, Wright P. 1997. Differential vulnerability of the CA1 and CA3 subfields of the hippocampus to superoxide and hydroxyl radicals *in vitro*. *J Neurochem.* 69(2):883-886.
- [72] Stepanichev MY, Zdobnova IM, Zarubenko II. *et al.* 2004. Amyloid-beta (25-35)-induced memory impairments correlate with cell loss in rat hippocampus. *Physiol Behav.* 80(5):647-655.

ANEXO

Se anexa el artículo, resultado de este trabajo de investigación, el cual fue publicado en la revista BMC Neuroscience en Noviembre de 2013.

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Estradiol prevents olfactory dysfunction induced by A- β 25–35 injection in hippocampus

Carlos Bernal-Mondragón¹, Selva Rivas-Arancibia¹, Keith M Kendrick^{2*} and Rosalinda Guevara-Guzmán^{1*}

Abstract

Background: Some neurodegenerative diseases, such as Alzheimer and Parkinson, present an olfactory impairment in early stages, and sometimes even before the clinical symptoms begin. In this study, we assess the role of CA1 hippocampus (structure highly affected in Alzheimer disease) subfield in the rats' olfactory behavior, and the neuroprotective effect of 17 beta estradiol (E₂) against the oxidative stress produced by the injection of amyloid beta 25–35.

Results: 162 Wistar rats were ovariectomized and two weeks after injected with 2 μ l of amyloid beta 25–35 (A- β _{25–35}) in CA1 subfield. Olfactory behavior was evaluated with a social recognition test, odor discrimination, and search tests. Oxidative stress was evaluated with FOX assay and Western Blot against 4-HNE, Fluoro Jade staining was made to quantify degenerated neurons; all these evaluations were performed 24 h, 8 or 15 days after A- β _{25–35} injection. Three additional groups treated with 17 beta estradiol (E₂) were also evaluated. The injection of A- β _{25–35} produced an olfactory impairment 24 h and 8 days after, whereas a partial recovery of the olfactory behavior was observed at 15 days. A complete prevention of the olfactory impairment was observed with the administration of E₂ two weeks before the amyloid injection (A- β _{25–35} 24 h + E₂) and one or two weeks after (groups 8 A- β + E₂ and 15 A- β + E₂ days, respectively); a decrease of the oxidative stress and neurodegeneration were also observed.

Conclusions: Our finding shows that CA1 hippocampus subfield plays an important role in the olfactory behavior of the rat. The oxidative stress generated by the administration of A- β _{25–35} is enough to produce an olfactory impairment. This can be prevented with the administration of E₂ before and after amyloid injection. This suggests a possible therapeutic use of estradiol in Alzheimer's disease.

Keywords: Amyloid beta, Neurodegeneration, Neuroprotection, Estrogen, Alzheimer's disease, Olfactory dysfunction

Background

Alzheimer's disease (AD), the most common neurodegenerative disorder in humans, is characterized by deterioration of cognitive and mental functions, including learning and memory skills; particularly those involving medial temporal lobe regions, such as the hippocampus [1]. Interestingly, odor perception and learning, which also involve medial temporal lobe structures, are often impaired early in the course of AD, and therefore olfactory processing

deficits may be a clinical manifestation of early pathology [2–4]. Studies have generally reported olfactory discrimination and learning deficits early in AD [5,6] followed by additional problems in detecting odors as the disease progresses [5,7]. There are many studies reporting the relation of olfaction impairment with different neurodegenerative diseases such as Parkinson, Alzheimer and Huntington. Devanand [8] reported that individuals who had presented olfactory dysfunction in the UPSIT test, two years later developed AD. The relationship between olfactory impairment and cognitive deficit in some neurodegenerative diseases such as Alzheimer has been well described, but the underlying mechanism of this relationship is unclear [9]. It has been shown that AD is characterized by the formation of extracellular deposits of A- β peptide [10] leading to the formation of

* Correspondence: k.kendrick.uestc@gmail.com; rguevara@unam.mx

²Key Laboratory for Neuroinformation, School of Life Science & Technology, University of Electronic Science & Technology of China (UESTC), 610054, Chengdu, P.R. China

¹Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Apdo, Postal 70250, D.F. México, Delegación Coyoacán 04510, Mexico

neuritic plaques, neurofibrillary and intraneuronal tangles of hyperphosphorylated *tau* protein, as well as by the microglia activation [11] in cortex and hippocampus.

It has been reported that one of the action mechanisms of A- β is through oxidative stress [12,13]. Several authors have used the A- β_{1-42} peptide in animal models to study AD. However, the fragment 25–35 of A- β seems to be the neurotoxic part of the whole protein. This fragment is capable of producing oxygen species that lead to neurodegeneration by oxidative stress production only [12,14]. In hippocampus, the injection in CA1 results in a neuronal degeneration and cell loss of the pyramidal cell layer affecting spatial memory in rats [15].

A- β_{25-35} cannot be produced through typical APP processing, but it is often selected as an alternative model to full-length A- β because it retains both its physical and biological properties. Perhaps the most important factor which was found to influence toxicity, however, was the aggregation state forming fibrils with β -structure and retaining the toxicity of the full-length peptide [16–19]. A- β_{25-35} , though not present in humans, is widely used by researchers instead of endogenous fragment A- β_{1-42} , which is not found to be at least as toxic as the full-length fragment [14,20].

The first reports on *in vivo* A- β_{25-35} were from a series of studies made by Maurice 1996 [21] and Delobette in 1997 [22] who demonstrated amnesia in mice and rats injected with this fragment. Likewise, long term or single A- β_{25-35} i.c.v injection induced a decline in social recognition behavior in rats [15,23,24] as well as impaired learning in a water maze test [21,22,25] and working memory in a Y maze or radial arm maze [15,21,26–28].

A useful animal model for investigating effects of A- β protein in AD has been to inject different versions of it directly into the brain. Thus, we are using in this project the A- β_{25-35} fragment in an olfactory behavior paradigm. To the best of our knowledge, no studies have so far investigated the effects of this fragment on olfactory perception and memory.

Estrogen is thought to play a protective role against neurodegeneration through a variety of mechanisms and to influence cognitive processes such as learning and memory. The mechanisms implicated include the activation of growth factors, the control of synaptic plasticity and reduced effects of toxicity [29]. There is some evidence to suggest that exposure to estrogen decreases the risk and delays the onset and progression of AD, most probably by reducing A- β production [30,31]. It has also been reported E₂ inhibits generation of superoxide radicals, thus preventing further propagation of reactive oxygen species (ROS) [32]. It has also been shown to interfere both with A- β production and clearance *in vitro* and *in vivo* in murine models [33].

In the present study, we have therefore investigated first whether A- β_{25-35} injected directly into the hippocampus (HIPP) or into the olfactory bulb (OB) in ovariectomized female rats produced both neurodegenerative changes in these regions and impaired olfactory perception and learning as well as spatial memory (spontaneous alternation). And secondly, whether treating animals with E₂ can prevent some or all of these effects.

Methods

Subjects

Adult female Wistar rats were used in the study. They were group-housed (4–5 per cage) with food and water available *ad libitum* and with an artificial 12 h light/dark regime (lights were on from 7 am to 7 pm). All experiments and animal welfare conditions were approved by the Ethical Committee of the Faculty of Medicine at the Universidad Nacional Autónoma de México and in accordance with the European Communities Council Directive. All efforts were made to minimize the number and suffering of animals used.

A total of 162 adult virgin female three-month Wistar rats from our house breeding colony were used as subjects and further 63 (20–22 days old) juvenile animals were used as test *stimuli* in the social recognition task. Adults weighed 248.42 g \pm 12.6 g and juveniles 112 \pm 6.48 g. The adult animals were ovariectomized under general anesthesia (ketamine/xylazine mixture, 15 mg/kg + 1 mg/kg, i.p) 15 days prior to the experimental procedure. In order to minimize the number of juvenile animals used, they were rotated for control and experimental groups. Adult and juvenile animals were caged individually 1 h prior to the social recognition tests and during the 60 min inter exposure interval. All the experiments were conducted during the light phase of the cycle, between 0700 h and 1300 h.

Injection of A- β

Stereotaxic surgery: All ovariectomized adult female Wistar rats were anesthetized with a ketamine/xylazine mixture (15 mg/kg + 1 mg/kg, i.p) and stereotaxic surgery was performed in a standard rodent stereotaxic frame (David Kopf, USA). The animals were divided into six control and twelve experimental groups (n = 9 animals per group) for the stereotaxic surgery. Three control groups were assigned for bilateral injection of phosphate buffer solution in HIPP and three more for OB, tested 24 h, 8 and 15 days after vehicle injection for social recognition behavior. Three experimental groups were injected with 2 μ l of A- β_{25-35} (1 μ g/100 μ M) dissolved in phosphate buffer and previously incubated at 37°C in a shaking-water bath for 72 h (to induce aggregation state) into the HIPP, tested 24 h, 8 or 15 days after A- β_{25-35} injection and other three groups were

injected before and after A- β injections with E₂, 25 μ g/kg s.c. daily injections for two weeks or one or two additional weeks (groups evaluated 8 days + E₂ or 15 days + E₂ after A- β ₂₅₋₃₅ injections respectively) and using propylene glycol as a vehicle. As a control for the E₂ injections, three additional groups received daily injections with the vehicle (subcutaneously propylene glycol) for two weeks and afterwards for one or two weeks (same as described in upper paragraph for E₂ injections) (See Figure 1). Co-ordinates for HIPP A- β ₂₅₋₃₅ and control injections were 4.2 mm posterior to Bregma, 3.0 mm lateral from midline and 2.6 mm ventral to dura [34]. Another six experimental groups received a bilateral injection of the A- β in the OB's co-ordinates: 7.1 mm rostral to bregma, 1.5 mm lateral to the midline, and 1.5 mm ventral to dura [34]. Three of these groups also received E₂ for two weeks and one or two weeks after, prior to A- β injection and tested either 24 h, 8 or 15 days later (same as HIPP groups); other groups received vehicle injections for two weeks and one or two weeks after A- β ₂₅₋₃₅ injection. After recovery from surgery, animals were housed together in groups. After behavioral testing was completed, the animals were sacrificed by decapitation and their brains removed and stored at -80°C for subsequent analysis.

Social recognition memory test

The social recognition procedure was similar to that described in our previous papers [35,36]. The protocol used was as follows: starting two days prior to A- β or control vehicle injection in HIPP or OB and just before the test, each adult rat was habituated to the test cage daily for four minutes (50X50X42 cm). Each testing

session consisted of a sequence of three 4-min trials. The first trial for the adult rat was a habituation period to the test cage; the second trial was the first encounter between the adult rat and the juvenile rat (social memory acquisition); the third trial was a re-exposure to the familiar animal together with an unfamiliar juvenile *stimulus* animals introduced simultaneously into the test cage 60 min after the social memory acquisition trial (IEI). Experimental groups were tested 24 h, 8 and 15 days after A- β ₂₅₋₃₅ injection into either HIPP or OB with or without E₂ treatment. Following each test, the cage was thoroughly cleaned. Video recording of investigatory behavior was used to assess the time spent by adult rats investigating the *stimulus* animal in the social recognition test. The data collected from video-recordings were transferred to an IBM computer for off-line analysis. Behaviors considered related to social recognition learning and memory were anogenital sniffing, close following, and pawing of the *stimulus* animal. The percentage of time investigating the familiar compared to that with the unfamiliar one was measured [37]. A selective recognition memory was considered present if there was first, a significant reduction in the mean duration time of exploration, between the first two encounters with the *stimulus* juvenile; and, secondly, if there was also significantly greater investigation time of the novel juvenile in the third trial compared with that for the familiar juvenile.

Olfactory perception and habituation tests

To test for possible general olfactory perception impairments, additional groups of ovariectomized animals were used (n = 9/group); for both HIPP and OB injections,

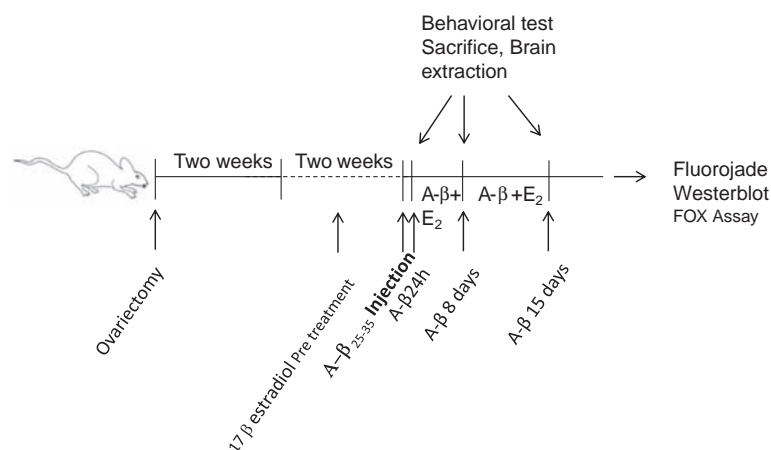


Figure 1 Scheme of time line of the procedure used. All rats were ovariectomized and let them recover for two weeks before any procedure was made. All experimental groups were pre-treated with 17 beta estradiol (E₂) (25 μ g/kg) for two weeks before A- β ₂₅₋₃₅ injection in HIPP or OB. 8 or 15 days + E₂ groups received one or two weeks respectively additional injections of E₂. Olfactory tests and brain extraction were carried out 24 h, 8 or 15 days after A- β ₂₅₋₃₅ injection.

one group was injected with vehicle alone and tested after 24 h, other groups were A- β_{25-35} injected and tested at 24 h, 8 and 15 days later (independent groups). Another group was pre-treated with E₂ for two weeks prior to A- β injection (A- β_{25-35} + E₂, 24 h group). Two additional groups were injected additionally with E₂ for one or two weeks, after A- β_{25-35} injection (A- β_{25-35} + E₂, 8 days and A- β_{25-35} + E₂, 15 day groups). For the olfactory perception test, individual animals were temporarily transferred from their home cage to another acrylic box and placed in the center, while a small piece of chocolate was buried in a random corner in the bedding of their home cage. Each animal was tested once and then returned to its home cage. The time it took them to locate and eat the chocolate chip was recorded (latency (up to a maximum of 120 s)). Latency to locate the buried piece of chocolate was the dependent variable in this analysis.

After the social recognition test was completed, we also evaluated non-social odor discrimination skills in all groups (adapted from Paolini and McKenzie) [38]. A lemon scented filter paper was introduced into a small perforated tube (5 cm long, 1.5 cm diameter) which was fixed on one of the walls of the experimental cage and the animal was allowed to explore it for two minutes. We repeated this procedure three times with ten-minute intervals between trials (IEI) and with the same scent (lemon) (three habituation trials). In the fourth discrimination trial, a vanilla scent was poured to the filter paper and the procedure was repeated. In order to test an odor preference, we also used other scents such as coffee and orange. We did not observe any preference or aversion to these odors (data not shown).

Spontaneous alternation behavior in a T-maze

A T-maze test [39] has been widely used to assess spatial memory in rats. This test analyzes the natural spontaneous exploratory behavior of rodents and other species [40]. We used this test to evaluate effects of A- β_{25-35} injection into the HIPP. Same control and experimental groups tested in the social recognition memory detailed above were used to evaluate effects on spatial memory. The T maze was made of black painted wood and covered by clear Plexiglas. Each arm was 30 cm long, 12 cm wide and 10 cm high. The floor of each arm was covered with paper, which was changed between trials. Each rat was placed at the end of one arm and allowed to move freely through the maze for eight minutes. The number of arm entries made by the animals, including returns into the same arm (errors), was visually recorded. Alternation was defined as entries into all three arms on consecutive occasions (triplets).

Measurement of lipid peroxidation (LPO)

After behavioral tests, control and experimental animals were sacrificed, their brains were placed on an ice-cold plate and HIPP, OB and frontal cortex dissected out and weighed immediately after. Each structure was homogenized in PBS 1:20 and divided into two tubes which were stored at -80°C until the day of the assay for LPO using a FOX assay Kit or for Western Blot. LPO was measured using the Peroxidetect kit (Sigma-Aldrich) which measures the colored adduct formed by xylenol orange and Fe₃₊ generated in presence of peroxides. Sample lipids were extracted using the Bligt & Dyer Protocol. For each ml of sample, 3.75 ml 1:2 (v/v) of CHCl₃: MeOH was added and mixed. In a second step, 1.25 ml of CHCl₃ was added and mixed, and then 1.25 ml of dH₂O was added and mixed. The samples were centrifuged at 1000 RPM for five minutes at room temperature to obtain a two-phase system and from which the organic phase was recovered. 100 μ l of the sample was placed in a tube; 1 ml of the working color reagent prepared from the kit was added. The mixture was incubated for 30 minutes at 25°C: the samples were read in a spectrophotometer at 560 nm using methanol as blank. A standard curve of t-BuOOH was plotted. Nanomols of peroxide were calculated using the standard curve and according to the formula:

$$\text{LPO value in nmol/ml} = (\text{Es}-\text{Eb}) \times 50.0 / (\text{Estd}) \\ \times (\text{Sample volume}) \quad (\text{Es} = \text{Sample Absorbance}, \\ \text{std} = \text{Absorbance of 1 nmol/peroxide from} \\ \text{the standard curve, Eb} = \text{Blank absorbance}).$$

Western blot for 4-hydroxynonenal

A Western Blot assay for quantifying 4-hydroxynonenal (4-HNE) adduct levels was performed. Proteins were separated by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE 10%) and transferred to nitrocellulose membranes. Membranes were collected and dried at room temperature until used. The membranes containing the samples (OB or HIPP) were blocked with 5% skimmed milk in TBS-T = 0.01% of Tween 20 (TBS-T) for 2 h at 37°C, and incubated with anti 4-HNE (R&D Systems) (1:1000) overnight under gentle shaking at 4°C. Membranes were rinsed three times with TBS-T, and thereafter were incubated with goat anti-rabbit IgG conjugated with horseradish peroxidase (1:10,000) (Sta. Cruz) for 1 h followed by three times rinsing with TBS-T. Recognized bands were visualized by chemiluminescence (ECL, General Electric).

Fluoro-Jade Staining

Degenerating neurons in HIPP and OB were labeled using Fluoro-Jade staining. All labeled neurons from the

dorsal hippocampus were counted. Four sections from each brain were used for statistics. For this technique, brains were first embedded in paraffin, cut into 7 μ m sections using a microtome and mounted on glass slides. Slides were then first immersed in a solution containing 1% sodium hydroxide in 80% alcohol (20 mL of 5% NaOH added to 80 mL absolute alcohol) for five minutes. This was followed by two minutes in 70% alcohol and two more minutes in distilled water. The slides were then transferred to a solution of 0.06% potassium permanganate for 10 minutes on a shaker table to ensure consistent background suppression between sections. They were then rinsed in distilled water for two minutes. The staining solution was prepared from a 0.01% stock solution for Fluoro-Jade C that was made by adding 10 mg of the dye powder to 100 mL of distilled water. To make up 100 mL of staining solution, 4 mL of the stock solution was added to 96 mL of 0.1% acetic acid vehicle. After 20 minutes in the staining solution, the slides were rinsed for one minute in each of three distilled water washes. Excess water was removed by briefly (about 15 s) draining the slides vertically on a paper towel. The slides were then placed on a slide warmer set at approximately 50°C, until they were completely dry. The dried slides were cleared by immersion in xylene for at least a minute before the analysis. For analysis, the average numbers of stained cells were counted in four sections from the HIPPO and OB of each animal. The sections were taken from the coordinates mentioned above.

Statistics

Behavioral data obtained during the social recognition task were expressed as ratios (investigation times of unfamiliar (unfamiliar + familiar)). Because ratios violate the homogeneity of variance assumption required by parametric statistics, the duration of social investigation ratios were arcsine-transformed prior to analysis [$\arcsin(\sqrt{\text{ratio}})$] [37]. Social investigation times were recorded for each animal and then these values were averaged and transformed according to the experimental group. To test for an overall effect of treatment (A- β_{25-35} injection) on the exploration time, a three factor analysis of variance (ANOVA) was carried out with brain region, treatment and treatment duration as factors reaching a significant difference of $p < 0.05$; post hoc planned contrast comparisons (corrected for multiple comparisons *Tukey* test) were made using a SPSS 15.0. Effects of A- β_{25-35} on discrimination of different odors were tested using a 4-way ANOVA with brain region (HIPPO/OB), treatment (vehicle, A- β_{25-35} , E2), treatment duration (24 h, 8 and 15 days) and odor trials as factors and followed by post-hoc tests. Effects of A- β_{25-35} on latencies to locate buried chocolate, LPO and Fluoro-Jade staining

were also analyzed using two or three-way ANOVAs. The results showed a significant statistical difference of $p < 0.05$ followed by *Tukey* post hoc tests.

Results

Figure 2 shows that injection of A- β_{25-35} in hippocampus decrease the novel:familiar ratio, increasing the investigation time for the familiar juvenile in the second encounter; in the groups evaluated 24 h and 8 days after injection, the animal is unable to distinguish between the juvenile familiar from the juvenile unfamiliar odor. The administration of E₂ reestablishes the time investigation as control groups. No effect was observed if the A- β_{25-35} injection was applied in the olfactory bulb. A three way ANOVA revealed main effects of treatment (Vehicle, Amyloid beta or E₂) ($F_{2,161} = 5.64$, $p = 0.004$) and treatment duration (24 h, 8 or 15 days) ($F_{2, 161} = 10.771$, $p < 0.001$) but not at brain region (HIPPO or OB) ($F_{1,161} = 0.805$, $p = 0.371$). There were also significant interactions between treatment and treatment duration ($F_{4,161} = 3.717$, $p = 0.007$) as well as treatment and brain region ($F_{2, 161} = 6.574$, $p = 0.002$) but not between treatment duration and brain region ($F_{2, 161} = 2.499$, $p = 0.086$). These show that treatment effects occurred mainly in the HIPPO, which were also reduced over time in the HIPPO. Finally, there was also a treatment x treatment duration x brain region interaction ($F_{3, 161} = 2.996$, $p = 0.033$) indicating again that treatment and treatment duration effects mainly occurred in the HIPPO rather than in OB. Post-hoc comparisons revealed there were significant differences between HIPPO and OB in both 24 h ($p = 0.03$) and 8 day ($p < 0.001$) groups, but no differences were found between the 15 day treatment groups ($p = 0.542$, NS). Post-hoc tests revealed that social recognition memory was significantly impaired by A- β injection in HIPPO in both the 24 h ($p < 0.001$) and 8 day ($p < 0.001$) treatment groups compared with that of control groups (vehicle). No differences were found with the 15 day treatment group compared with that of the control group ($F_{5, 54} = 4.30$ $p = 0.73$, NS). Pre-treatment with E₂ in the HIPPO groups significantly improved olfactory recognition memory in the 24 h ($p < 0.001$) and 8 day ($p < 0.001$) groups compared to those with A- β_{25-35} alone and to a level which did not differ significantly from that of controls (24 h $p = 0.73$; 8 days $p = 0.113$). No significant effect was observed when E₂ was injected two weeks before and two weeks after A- β_{25-35} injection in the 15 day A- β_{25-35} + E₂ compared with 15 day A- β alone group ($p = 0.177$ NS).

It called our attention the significant differences observed between the OB vehicle group and A- β_{25-35} plus E₂ group with the 15 day treatment duration ($p = 0.008$). This can be interpreted as a possible influence of estrogens in memory.

After A- β_{25-35} injection in HIPPO, the lesion provoked by the cannula in the CA1 region as well as in the OB can

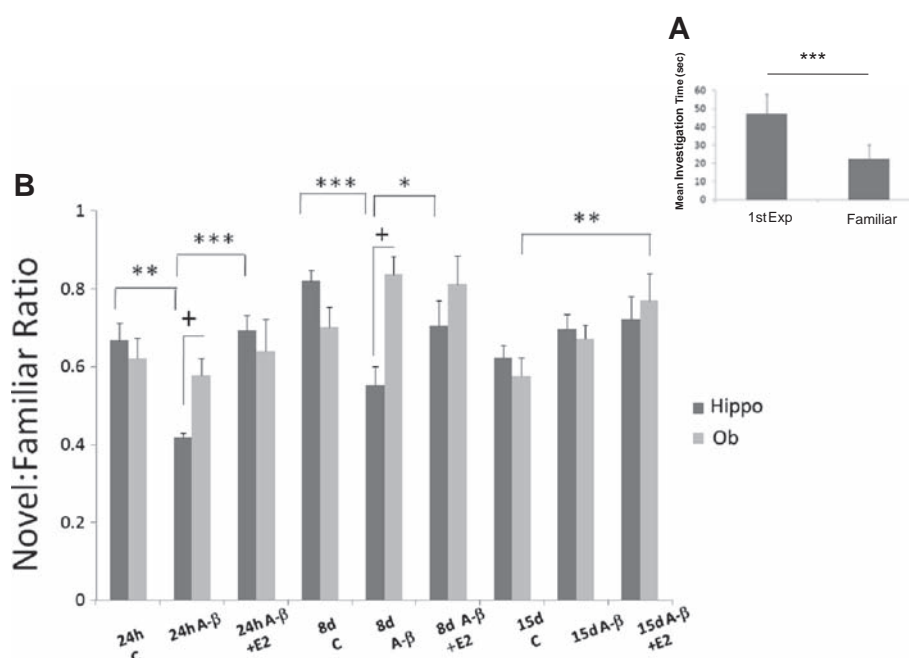


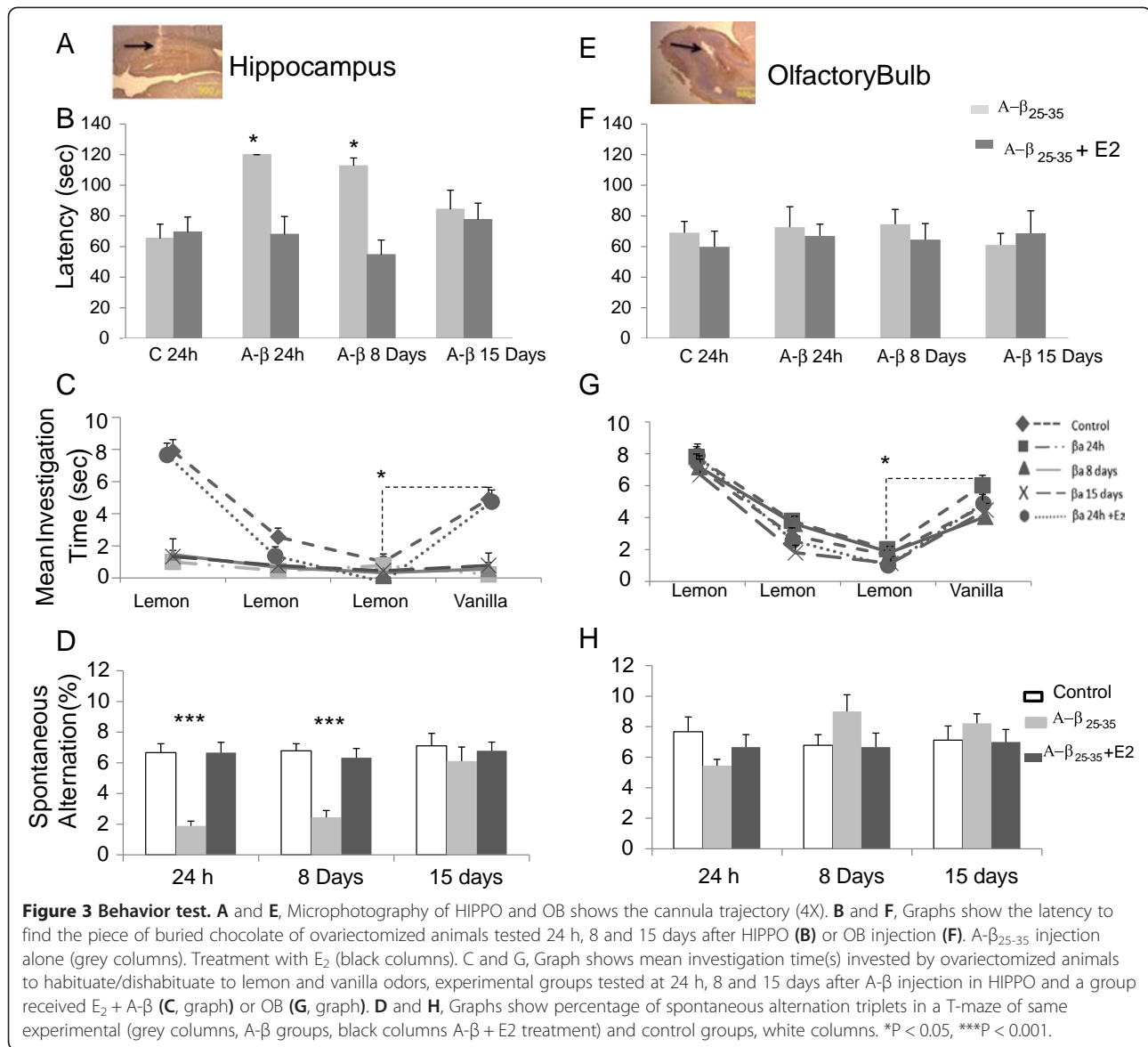
Figure 2 Olfactory memory acquisition. **A.** Olfactory memory acquisition in social investigation, control group. **B.** Ratios of time investigating the familiar or the unfamiliar juvenile rat. Adult ovariectomized female rats tested at 60 min IEL. Control groups (vehicle) evaluated at 24 h, 8 and 15 days after vehicle injection. Experimental groups injected with A-β₂₅₋₃₅ and A-β + E₂. HIPP (black columns) or OB (grey columns) evaluated at same times as control groups. *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001, comparison intergroup. +P < 0.05 comparison between OB and HIPP groups.

easily be seen. Figure 3A shows a microphotograph of a typical cannula placement in the HIPP and Figure 3E in OB.

Figure 3B and F show mean latencies to locate buried chocolate in the A-β₂₅₋₃₅ injected HIPP and OB groups and the ones which received additional E₂. A three-way ANOVA revealed main effects of treatment ($F_{2, 89} = 10.25$, $p < 0.0001$), treatment duration ($F_{2, 89} = 4.90$, $p < 0.01$) and brain region ($F_{1, 89} = 54.3$, $p < 0.0001$). There was also significant interaction between treatment and brain region ($F_{2,89} = 6.55$, $p = 0.002$) and between treatment duration and structure ($F_{2,89} = 4.9$, $p < 0.01$) showing that the A-β₂₅₋₃₅ treatments, and their duration, had different effects in the HIPP and in OB. Post-hoc comparisons revealed significant increases in latency in the 24 h, 8 days HIPP A-β₂₅₋₃₅ groups compared to those of vehicle injected controls or the A-β₂₅₋₃₅ groups treated with E₂ ($p < 0.05$ in all cases) but no differences between the three A-β₂₅₋₃₅ treatment durations. Indeed, none of the animals were able to find the chocolate within the 120 s test duration, while all the animals in the control group succeeded well within this time. On the other hand, no differences were found between A-β₂₅₋₃₅ injections from A-β₂₅₋₃₅ + E₂ injection in the olfactory bulb.

Figures 3C and G show the mean investigation times in the habituation-dishabituation odor discrimination paradigm in experimental and control HIPP and OB

groups. They were recorded in tests at 24 h, 8 or 15 days after A-β₂₅₋₃₅ or control injections and for 24 h A-β₂₅₋₃₅ treatment preceded by two weeks of E₂. A 4-factor ANOVA with treatment (treatment duration, trials and brain region as factors) revealed significant main effects of treatment ($F_{2, 161} = 192.17$, $p < 0.0001$), trial ($F_{3, 647} = 395.3$, $p < 0.0001$) and brain region ($F_{1, 647} = 45.0$, $p < 0.0001$) but not of treatment duration ($F_{2, 647} = 0.93$, $p = 0.396$). There were also significant interactions between treatment and brain region ($F_{2, 647} = 54.97$, $p < 0.0001$), treatment and trial ($F_{6, 647} = 33.03$, $p < 0.0001$) and between trial and brain region ($F_{3, 647} = 2.763$, $p = 0.041$) and also for treatment x trial x brain region ($F_{6, 647} = 11.11$, $p < 0.0001$). In general, these show that the A-β₂₅₋₃₅ treatment only had a significant effect on investigation times across trials in the HIPP compared with those on the OB. Post-hoc analysis revealed that both HIPP and OB (trial 1 $p < 0.001$ vs. trials 2 and 3 in both cases) control groups showed a clear habituation to the lemon odor test across the three trials and a clear dishabituation (trial 4 vs. trial 3, $p < 0.001$ in both cases) response was obtained after presentation of a different odor on trial 4 (vanilla). For the HIPP experimental groups tested 24 h, 8 or 15 days after A-β injection, no significant habituation was observed ($p > 0.05$ in all cases). However, the group that received E₂ pre-treatment before the A-β₂₅₋₃₅ injection did not differ significantly from the control



groups ($p > 0.05$ in all cases) while it did from 24 h, 8 and 15 day treatment groups ($P < 0.0001$ in all cases). The treated A- β OB showed a pattern of habituation/dishabituation across trials that did not differ from that of controls ($p < 0.05$ in all cases).

Figures 3D and H show the effects of HIPP and OB A- β_{25-35} and E₂ treatments on spontaneous alternation behavior. There were significant main effects of treatment ($F_{2, 143} = 15.4$, $p < 0.0001$), treatment duration ($F_{2, 143} = 5.63$, $p = 0.005$) and brain region ($F_{1, 143} = 8.13$, $p = 0.005$). Significant interactions were found between treatment and brain region ($F_{2,143} = 25.42$, $p < 0.0001$) and treatment duration and brain region ($F_{2,143} = 10.68$, $p < 0.0001$) indicating that HIPP treatment effects were greater than those for OB treatment at 24 h and 8 day time points. There

was also a significant interaction between treatment and treatment duration ($F_{2,143} = 18.35$, $p < 0.0001$) indicating again that treatment effects were only at the 24 h and 8 day time points. Post-hoc tests revealed that A- β injection in the HIPP impaired spontaneous alternation behavior at the 24 h and 8 day time points compared with that of the control group and the group pre-treated with E₂ ($p < 0.0001$ in all cases). The 24 h E₂ pretreated group and 15 day A- β_{25-35} treatment groups did not significantly differ from the control one ($p = 0.26$ and 0.92 , respectively).

Figures 4A and 5A show that LPO levels were high in both HIPPO and OB by 24 h after A- β_{25-35} injection but not in the frontal cortex (which was used only as a reference structure). A three-way ANOVA revealed that levels

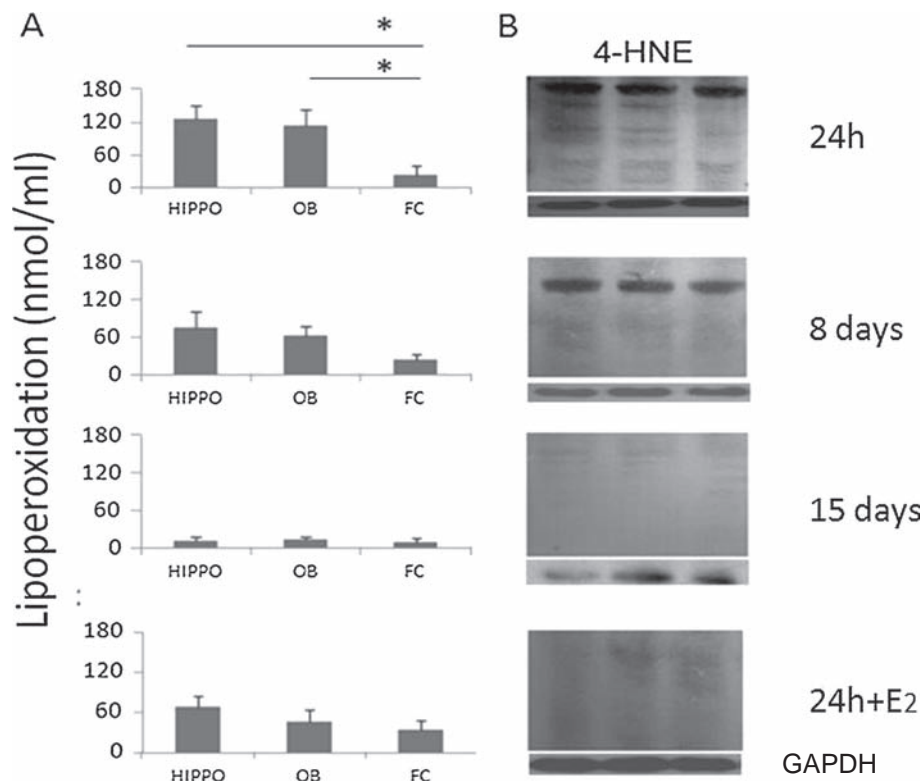


Figure 4 Effect of A- β injection in HIPPO. **A** Effect of A- β_{25-35} injection in HIPPO on lipid peroxidation levels in HIPPO, OB and Frontal Cortex (FC) of ovariectomized animals. Mean \pm SEM lipid peroxidation levels in the four experimental groups (24 h, 8 and 15 days groups and 24 + E₂). The lipid peroxidation levels in nanomoles/ml of homogenate HIPPO, OB or FC tissue depicted on the ordinate. Minimal amount of lipoperoxidation was detected 15 days after A- β_{25-35} injection. E₂ replacement decreases the lipoperoxidation in HIPPO as well as in OB. **B** Western blot technique to measure 4-HNE adduct in Hippocampus reflects the lipoperoxidation in HIPPO, OB and FC in the same experimental groups. The amount of 4-HNE adducts, is related with the presence of peroxides in the structure, the administration of E₂ decreases the presence of peroxides and the amount of 4-HNE.

of lipoperoxidation (LPO) varied significantly, with main effects of treatment ($F_{1, 119} = 20.93$, $p < 0.0001$), treatment duration ($F_{2, 119} = 46.23$, $p < 0.0001$) and brain region ($F_{2, 119} = 6.13$, $p = 0.003$). There were also significant interactions between treatment and brain region ($F_{2,119} = 7.06$, $p < 0.001$) and between treatment duration and brain region ($F_{4,119} = 5.05$, $p < 0.001$) indicating that A- β_{25-35} injections produced greater effects in the HIPP and OB than in the frontal cortex. Post-hoc tests showed that the group pre-treated with E₂ showed significantly lower levels of lipoperoxidation in both HIPP and OB 24 h after A- β_{25-35} injection compared to those of the group treated with A- β_{25-35} alone for 24 h ($p < 0.05$ in both cases). The Western Blot analyses of lipid peroxidation 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE) protein adduct showed high levels after A- β_{25-35} injection in HIPPO and OB but not in the frontal cortex (Figures 4B and 5B). The A- β_{25-35} HIPP injection group treated with E₂ showed a reduced presence of 4-HNE (Figure 4B).

Fluoro-Jade staining revealed the presence of degenerating neurons in HIPP at 24 h, 8 days and 15 days after

A- β_{25-35} injection (Figures 6C,D,E and F) but not in the OB (data not shown). There was also no evidence for Fluoro-Jade stained degenerating neurons in the HIPP or OB following OB injection of A- β_{25-35} . A two-way ANOVA was therefore performed only on the groups with HIPP injections and with treatment and treatment duration as factors. This showed significant main effects of treatment ($F_{1, 15} = 18.67$, $p < 0.001$) but not treatment duration ($F_{2, 15} = 0.269$, $p = 0.769$). Post-hoc pairwise comparisons revealed a significant difference between the 24 h A- β_{25-35} injected group and the 24 h A- β group pre-treated with E₂ ($p < 0.001$). There was also a significant reduction in the number of staining cells in the A- β_{25-35} 15 day group compared with the 24 h one ($p < 0.05$).

Discussion

Our results demonstrate that bilateral injections of the A- β_{25-35} fragment in the HIPP of ovariectomized female rats produce marked deficits in olfactory perception and social recognition and spatial memory as shown in Figures 2 and 3. Bilateral injections of the same dose of

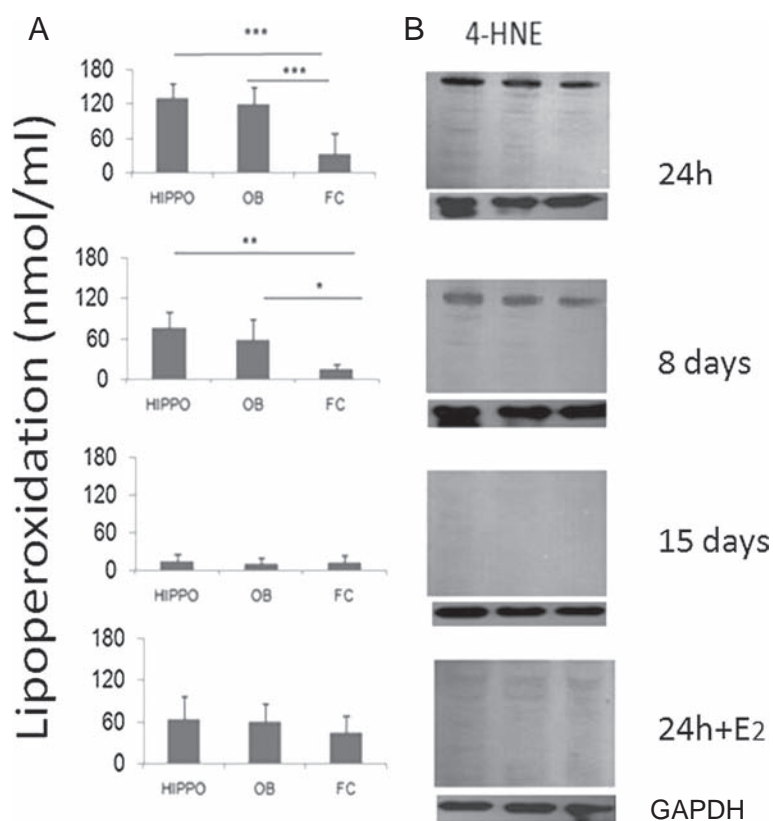


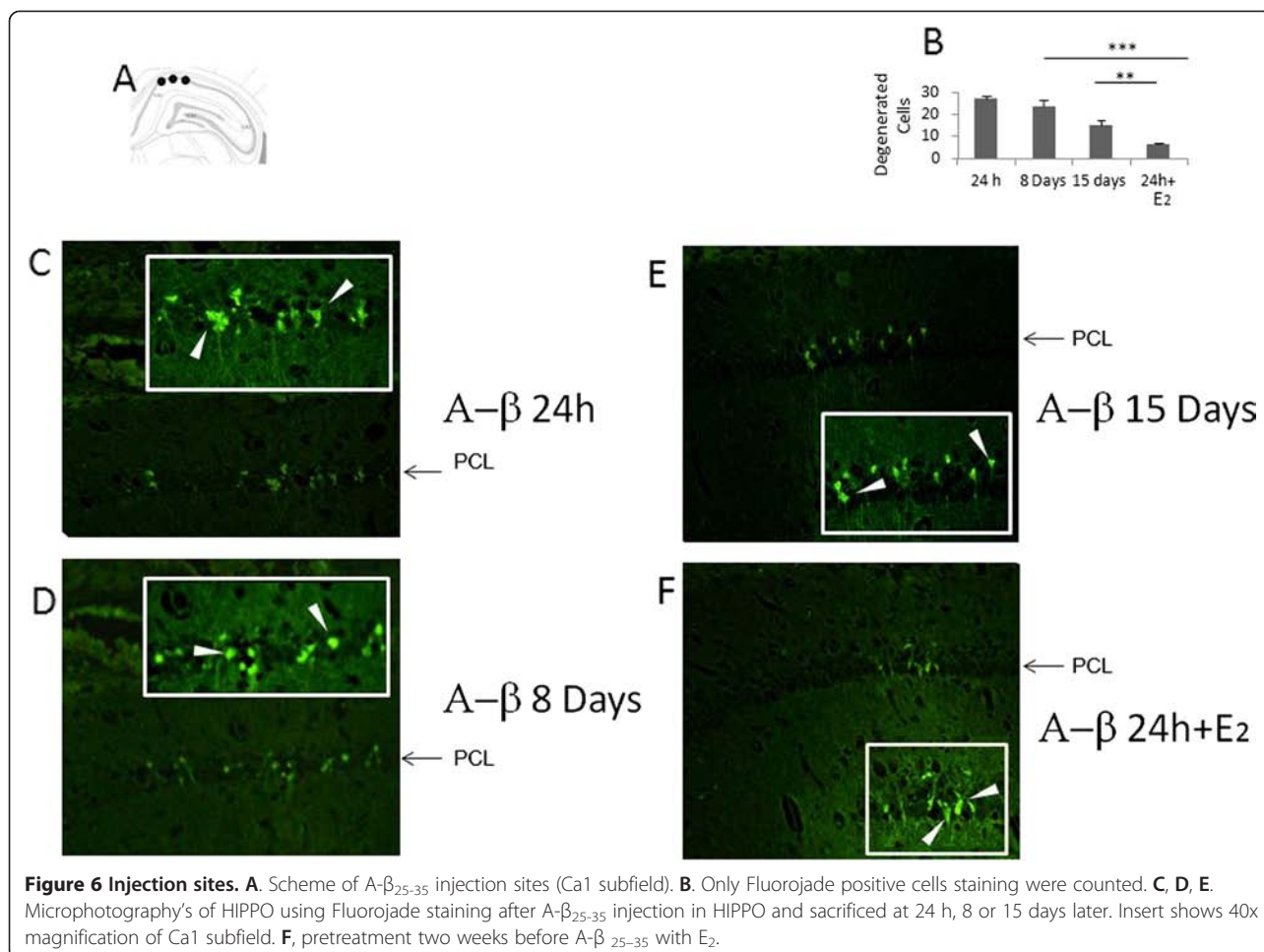
Figure 5 Effect of A- β injection in OB. **A.** Effect of A- β_{25-35} injection in OB on lipid peroxidation levels in HIPPO, OB and Frontal Cortex (FC) of ovariectomized animals. Mean \pm SEM lipid peroxidation levels in the four experimental groups (24 h, 8 and 15 days and E₂ replacement groups). The lipid peroxidation levels in nanomoles/ml of homogenate HIPPO, OB or FC tissue depicted on the ordinate. Significant differences were found in 24 h experimental group between HIPPO and OB compared with FC tissue. Minimal amount of lipoperoxidation was detected 15 days after A- β injection in the three structures evaluated. E₂ decreases the lipoperoxidation in HIPPO as well as in OB. **B.** Western blot technique to measure 4-HNE adduct in OB reflects the lipoperoxidation in HIPPO, OB and FC in the same experimental groups. The amount of 4-HNE adducts is related with the presence of peroxides in the structure, the administration of E₂ decreases the presence of peroxides and the amount of 4-HNE.

A- β_{25-35} into the OB did not produce any behavioral impairment. These behavioral effects of HIPP A- β_{25-35} β injections were associated with increased LPO and 4-NE, in both HIPP and OB; although only with injections into the HIPP did actual neuronal degeneration occur in the HIPP, as shown in Figure 4. These behavioral and degenerative effects of A- β_{25-35} injection occurred at 24 h and 8 days after treatment although they had largely disappeared by 15 days post injection. It is important to highlight that two weeks pre-treatment before A- β_{25-35} injection, with E₂ or one or two weeks after prevented the occurrence of all perceptual and memory impairments and significantly reduced associated neurodegenerative changes. Thus, E₂ treatment can play a potent role in protecting the brain from the neurotoxic effects of A- β_{25-35} .

A- β is the main constituent of senile plaques found in the aging brain and has been extensively linked with disturbances of learning and memory processing

characteristics of aging-associated disorders, such as AD [1,41]. It is also known that aggregation of the amyloid peptides is responsible for neurotoxicity [20,42,43].

Up to date, there is no data regarding the formation of plaques in A- β_{25-35} injection models. Which was neither observed in our model in any of the time points being assessed (24 h, 8 and 15 days). The injections of A- β_{25-35} did not produce neurodegenerative changes restricted to the region of the injection. At this point, we are unsure how the A- β_{25-35} spread from the HIPP to OB and vice versa despite simple transport within the cerebroventricular system seems unlikely due to the absence of effects in the frontal cortex. Instead, a more likely explanation is transport along migratory routes between the two structures. Both HIPP and OB are sites of neurogenesis within the brain but also where cells migrate from the sub-ventricular zone into both regions. [44]. Stem cells applied intranasally have also been shown



to track from olfactory regions into the HIPP [45] so our findings may suggest a mechanism where A- β formation occurring within the OB can rapidly move into the HIPP and vice versa.

Our finding that both olfactory perception and social recognition memories were impaired following A- β_{25-35} injection into the HIPP was also unexpected as a previous research work suggested a role for the HIPP in social recognition memory [46] and other forms of olfactory memory [47-49] but not in olfactory perception *per se*. Possibly, the profound olfactory perception deficits we observed may have been caused by the spread of A- β from the HIPP to the OB, although we did not find similar deficits following direct injection of the same A- β_{25-35} dose into the OB despite similar levels of lipoperoxidation. However, as a result of the olfactory perception deficits, we obviously cannot conclude that social recognition memory was impaired since this is highly dependent on odor cues [50]. Nevertheless, since deficits in a non-odor dependent spatial memory task

spontaneous alternation were also found, we can conclude that the A- β_{25-35} injection into the HIPP impaired both olfactory perception and spatial learning. These data suggest that neurodegeneration in HIPP could explain in part, olfactory impairment found in some neurodegenerative diseases such as Alzheimer's.

Our findings show that oxidative stress due to A- β_{25-35} injection failed to produce actual neurodegeneration in the OB which was expected to happen given the effects observed following HIPP injections. However, there is evidence that the pyramidal neurons of the CA1 HIPP subfield are very sensitive to oxidative stress [51] and so perhaps this may explain why only the HIPP show actual evidence for neurodegenerative cells thus resulting in behavioral changes. Other studies have also reported that A- β_{25-35} can damage the HIPP and impair learning and short-term memory [15,52,53]. Another one has reported that bilateral injection of A- β_{25-35} into the amygdala of rats induced histopathological changes such as the appearance of reactive astrocytes and neuronal shrinkage, but did not cause any disturbance in

spatial learning or in conditioned avoidance learning [54]. Interestingly, in agreement with our observations, spatial memory impairments following intracerebroventricular (i.c.v) injections of A- β_{25-35} have also been reported to be correlated with actual neuronal cell loss in HIPP [53].

LPO is a reliable marker of oxidative stress because it reflects damage to membranes and produces a variety of damaging reactive oxidizing species associated with cell death [55]. For instance, oxidative stress caused by environmental *stimuli* is proposed to be involved in brain neuronal death in many neurodegenerative disorders such as Alzheimer's and Parkinson's diseases [56].

Previous evidence from our laboratory has shown that ozone inhalation causes oxidative stress in a number of different brain regions in rats [57,58] and in this paper, we show that A- β_{25-35} injection in the HIPP increases LPO in it as well as in the OB compared with control groups. It is well known that HIPP is one of the key sites vulnerable to neurotoxicity *in vivo* and in relation to AD [52,59].

Our experiments showed that both behavioral and neurodegenerative impairments induced by A- β_{25-35} injections were transient with changes either fading or disappearing by 15 days post-injection. To the best of our knowledge, this ability of the brain to largely recover from the neurotoxic effects of A- β_{25-35} injections has not been reported, with most studies focusing on single time points [15,27,52].

For instance, in the hippocampus, there are reports that CA1 region neurons are more susceptible to oxidative stress impairment than CA2 or CA3 neurons [60]. The aforementioned statement means that even though similar oxidative levels are produced by the A- β_{25-35} injection in both sites HIPP and OB, it results in a neuronal degeneration in only the CA1 region of the hippocampus but not in the that of the olfactory bulb where the olfactory behavior remains intact even after being the A- β_{25-35} injected directly in the bulb. In fact, in order to produce an olfactory behavior impairment injecting the A- β_{25-35} in the OB, we need to administer a double dosage than that in HIPP (4 μ l), (data not shown), which evidences the susceptible difference to oxidative stress between hippocampus and olfactory bulb neurons.

A- β_{25-35} injection in the hippocampus produces a fluctuation in the spatial behavior [15,61]. In our model, we found that there are also fluctuations in the rat's olfactory behavior; these are observed in the first few days after A- β_{25-35} injection as Figures 2 and 3 show. However, a recovery of the olfactory behavior is observed afterwards.

It has been reported that cell neurogenesis in the subventricular area and its migration to the lesion area may partly explain this recovery [62]. Our injection model shows that the affected neurons are those found

in an adjacent A- β_{25-35} injected area, no bigger than 600 microns, thus the impairment does not invade other areas of the hippocampus keeping the rest of the structure's functions intact.

Some studies have reported memory impairments following i.c.v A- β_{25-35} administration after periods around or in excess of 15 days [15]. It is possible, therefore, that the brain's capacity to compensate following A- β treatment may be increased when localized injections in the HIPP or OB are used as opposed to more global i.c.v administration. There is continuous cell migration from the subventricular and subgranular zones of the HIPP to the OB and to the HIPP itself following damage [59]. Thus, possibly, cell migration from the subventricular zone to the OB together with neurogenesis within the OB contributed to both functional and neurodegenerative recovery by 15 days after HIPP A- β_{25-35} injections and E₂ treatment.

The A- β_{25-35} induced neurodegeneration is traceable by means of a Fluoro-Jade C technique which is positive from 24 hours after injection. This technique mainly stains the neurons in degeneration process [63]. This degeneration will result in cell death and the neuronal remains will eventually vanish together with the astrogliosis and inflammatory reaction. As the Fluoro-Jade C is mainly used to signal the cells in degeneration process, the intensity of the signal gathered at day 15 is lesser than that obtained at 24 hours or 8 days later, there are scarcely left few neuronal remains, thus, less fluorescence. When we assess hippocampus cuts stained with eosin and hematoxylin after 15 days, we can observe the absence of pyramidal neurons in the injected area.

Neuroprotective actions of estradiol have been shown in a number of different contexts [29,32]. The 17 β -estradiol dosage used in this research work has shown to have antioxidant effects in other models such as the exposure to ozone [57,58]. In the current study, the protective effects we observed following a two week pre-treatment and a one or two weeks after E₂ in ovariectomized rats were clearly very strong, with a complete absence of any olfactory perception or olfactory learning or spatial learning deficits. While, following the E₂ treatment, there was still some evidence for increased lipoperoxidation and neurodegenerative changes at 24 h after A- β_{25-35} treatment in either HIPP or OB; this was significantly lower compared with that of A- β_{25-35} treatment alone. There is a significant decrease in the lipoperoxidation levels after A- β_{25-35} injection in the group with estradiol supplement, while in the groups without it the oxidative stress levels were higher. It can be observed that the dosage used (25 mg/kg) has an antioxidant effect which is reflected in a lower neuronal degeneration which is related to a lesser intensity of the Fluoro-Jade stain.

We have previously shown that similar E₂ treatment to ovariectomized rats protects against ozone-induced olfactory memory deficits and lipoperoxidation in the olfactory system [58]. Here, we have extended these findings to include protection against the neurodegenerative and behavioral effects of A-β.

We deliberately chose to use an ovariectomy model in order to demonstrate potential neuroprotective effects of E₂ treatment since it reflects similar hormonal changes that occur in women following menopause. While the incidence of AD is significantly higher in women than in men, clear evidence that post-menopausal reductions in estrogens contribute to this as opposed to greater longevity has yet to be produced [64–66], despite early influential studies suggesting otherwise [30,31]. It does, however, seem that there may be a particular period of vulnerability in the early stages of menopause and there is still considerable interest in establishing potential therapeutic efficacy of estrogen treatment [64]. At this stage, studies in rodents have reported that brain estrogens deficiency can accelerate A-β plaque formation in a transgenic mouse model of AD [67]. It also seems to be that both estrogen α and β-receptors may contribute to increases and decreases respectively in hippocampal apolipoprotein E expression [68]. Furthermore, the potential neuroprotective mechanism whereby estrogen is acting to reduce A-β may be due to reductions in oxidative stress via the mitochondria. Clearly, we still need further evidence to support both estrogen interactions with A-β injection as well as its potential for therapeutic use in AD.

Conclusions

In summary, our results have demonstrated significant impairments of olfactory perception and spatial memory function 24 h and 8 day following injection of A-β_{25–35} in the HIPP, but not in the OB of ovariectomized rats. These behavioral changes were associated with evidence of high levels of lipoperoxidation in both HIPP and OB and the presence of degenerating neurons in HIPP. A two-week pre-treatment or one or two weeks after with E₂ in ovariectomized rats completely prevented the occurrence of behavioral impairments and markedly reduced neurodegenerative changes 24 h after A-β_{25–35} injection into the HIPP. These results further suggest an important neuroprotective role for estrogens against A-β_{25–35} induced neurotoxic damage with potential relevance to treatment of AD, particularly in the context of post-menopausal women.

Abbreviations

AD: Alzheimer's disease; A-β: Amyloid beta; i.c.v.: Intracerebroventricular; APP: Amyloid precursor protein; ROS: Reactive oxygen species; E₂: 17β estradiol; i.p.: Intra peritoneal; IEI: Inter exposure interval; HIPP: Hippocampus; OB: Olfactory bulb; s.c.: Subcutaneous; LPO: Lipoperoxidation.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

CBM participated in the design of the study, experimental procedure and writing of the manuscript. SRA participated in the design of the study and analysis of the results. KMK participated in the analysis of the data and the writing of the manuscript. RGG participated in the design of the study, analysis of the data, corrected the manuscript and guidance through the project. All the authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

The work was supported by the PAPIIT: IN 216907 and CONACyT24784 and 152613.

We would like to thank Alfredo Miranda-Martínez, Octavio Mercado-Gómez and Virginia Arriaga-Ávila for their technical support and Josefina Bolado for the English revision.

Author details

¹Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Apdo, Postal 70250, D.F. México, Delegación Coyoacán 04510, Mexico. ²Key Laboratory for Neuroinformation, School of Life Science & Technology, University of Electronic Science & Technology of China (UESTC), 610054, Chengdu, P.R. China.

Received: 14 January 2013 Accepted: 19 September 2013

Published: 24 September 2013

References

1. Irvine GB, El-Agnaf OM, Shankar GM, Walsh DM: **Protein aggregation in the brain: the molecular basis for Alzheimer's and Parkinson's diseases.** *Mol Med* 2008, **14**(7–8):451–464.
2. Braak H, Braak E: **Neuropathological staging of Alzheimer-related changes.** *Acta Neuropathol* 1991, **82**(4):239–259.
3. Talamo BR, Rudel R, Kosik KS, Lee VM, Neff S, Adelman L, Kauer JS: **Pathological changes in olfactory neurons in patients with Alzheimer's disease.** *Nature* 1989, **337**(6209):736–739.
4. Xu Y, Jack CR Jr, O'Brien PC, Kokmen E, Smith GE, Ivnik RJ, Boeve BF, Tangalos RG, Petersen RC: **Usefulness of MRI measures of entorhinal cortex versus hippocampus in AD.** *Neurology* 2000, **54**(9):1760–1767.
5. Eichenbaum H, Morton TH, Potter H, Corkin S: **Selective olfactory deficits in case H.M.** *Brain* 1983, **106**(2):459–472.
6. Koss E, Weiffenbach JM, Haxby JV, Friedland RP: **Olfactory detection and recognition in Alzheimer's disease.** *Lancet* 1987, **1**(8533):622.
7. Serby M, Larson P, Kallkstein D: **The nature and course of olfactory deficits in Alzheimer's disease.** *Am J Psychiatry* 1991, **148**(3):357–360.
8. Devanand DP, Michaels-Marston KS, Liu X, Pelton GH, Padilla M, Marder K, Bell K, Stern Y, Mayeux R: **Olfactory deficits in patients with mild cognitive impairment predict Alzheimer's disease at follow-up.** *Am J Psychiatry* 2000, **157**(9):1399–1405.
9. Djordjevic J, Jones-Gotman M, De Sousa K, Chertkow H: **Olfaction in patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease.** *Neurobiol Aging* 2008, **29**:693–706.
10. Tabner BJ, Turnbull S, El-Agnaf OM, Allsop D: **Formation of hydrogen peroxide and hydroxyl radicals from A(βeta) and alpha-synuclein as a possible mechanism of cell death in Alzheimer's disease and Parkinson's disease.** *Free Radic Biol Med* 2002, **32**:1076–1083.
11. Maccioni RB, Muñoz JP, Barbelto L: **The molecular bases of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders.** *Arch Med Res* 2001, **32**(5):367–381.
12. Gulyaeva NV, Stepanichev MY: **Aβ(25–35) as proxyholder for amyloidogenic peptides: in vivo evidence.** *Exp Neurol* 2010, **222**:6–9.
13. Kaminsky YG, Kosenko EA: **Effects of amyloid-beta peptides on hydrogen peroxide-metabolizing enzymes in rat brain in vivo.** *Free Radic Res* 2008, **42**(6):564–573.
14. Kaminsky YG, Marlatt MW, Smith MA, Kosenko EA: **Subcellular and metabolic examination of amyloid-beta peptides in Alzheimer disease pathogenesis: evidence for abeta(25–35).** *Exp Neurol* 2010, **221**(1):26–37.
15. Stepanichev MY, Moiseeva YV, Lazareva NA, Onufriev MV, Gulyaeva NV: **Single intracerebroventricular administration of amyloid-beta (25–35) peptide induces impairment in short-term rather than long-term memory in rats.** *Brain Res Bull* 2003, **61**(2):197–205.

16. Del Mar M-SM, Villalain J, Gómez-Fernández JC: Structure of the Alzheimer beta-amyloid peptide (25–35) and its interaction with negatively charged phospholipid vesicles. *Eur J Biochem* 1999, **265**(2):744–753.
17. Iversen LL, Mortishire-Smith RJ, Pollack SJ, Shearman MS: The toxicity *in vitro* of beta-amyloid protein. *Biochem J* 1995, **311**:1–16.
18. Terzi E, Hölzemann G, Seelig J: Alzheimer beta-amyloid peptide 25–35: electrostatic interactions with phospholipid membranes. *Biochemistry* 1994, **33**(23):7434–7441.
19. Catricala S, Torti M, Ricevuti G: Alzheimer disease and platelets: how's that relevant. *Immun Ageing* 2012, **9**:20.
20. Yankner BA, Dawes LR, Fisher S, Villa-Komaroff L, Oster-Granite ML, Neve RL: Neurotoxicity of a fragment of the amyloid precursor associated with Alzheimer's disease. *Science* 1989, **245**:417–420.
21. Maurice T, Lockhart BP, Privat A: Amnesia induced in mice by centrally administered beta-amyloid peptides involves cholinergic dysfunction. *Brain Res* 1996, **706**(2):181–193.
22. Delobette S, Privat A, Maurice T: *In vitro* aggregation facilitates beta-amyloid peptide-(25–35)-induced amnesia in the rat. *Eur J Pharmacol* 1997, **319**(1):1–4.
23. Terranova JP, Kan JP, Storme JJ, Perreaut P, Le Fur G, Soubrié P: Administration of amyloid beta-peptides in the rat medial septum causes memory deficits: reversal by SR 57746A, a non-peptide neurotrophic compound. *Neurosci Lett* 1996, **213**(2):79–82.
24. Klementiev B, Novikova T, Novitskaya V, Walmod PS, Dmytriyeva O, Pakkenberg B, Berezin V, Bock E: A neural cell adhesion molecule-derived peptide reduces neuropathological signs and cognitive impairment induced by Abeta25-35. *Neuroscience* 2007, **145**(1):209–224.
25. Mugantseva EA, Podolskii I: Central administration of the amyloid beta-peptide (25–35) and individual features of cognitive behavior of rats. *ZhVyssh Nerv Deiatim I P Pavlova* 2009, **59**(5):616–621.
26. Meunier J, Ieni J, Maurice T: The anti-amnesic and neuroprotective effects of donepezil against amyloid b25-35 peptide-induced toxicity in mice involve an interaction with the σ_1 receptor. *Br J Pharmacol* 2006, **149**(8):998–1012.
27. Villard V, Espallergues J, Keller E, Alkam T, Nitta A, Yamada K, Nabeshima T, Vamvakides A, Maurice T: Antiamnesic and neuroprotective effects of the aminotetrahydrofuran derivative ANAVEX1-41 against amyloid beta (25–35)-induced toxicity in mice. *Neuropsychopharmacol* 2009, **34**:1552–1566.
28. Yamaguchi Y, Kawashima S: Effects of amyloid-beta-(25–35) on passive avoidance, radial-arm maze learning and choline acetyltransferase activity in the rat. *Eur J Pharmacol* 2001, **412**:265–272.
29. Behl C: Oestrogen as a neuroprotective hormone. *Nature Rev Neurosci* 2002, **3**:433–442.
30. Tang MT, Jacobs D, Stern Y, Marder K, Schofield P, Gurland B, Andrews H, Mayeux R: Effect of oestrogen during menopause on risk and age at onset of Alzheimer's disease. *Lancet* 1996, **348**:429–432.
31. Xu H, Gouras GK, Greenfield JP, Vincent B, Naslund J, Mazzarelli L, Fried G, Jovanovic JN, Seeger M, Relkin NR, Liao F, Checler F, Buxbaum JD, Chait BT, Thinakaran G, Sisodia SS, Wang R, Greengard P, Gandy S: Estrogen reduces neuronal generation of Alzheimer A- β 25–35 peptides. *Nat Med* 1998, **4**:447–451.
32. Ayres S, Abplanal W, Liu JH, Subbiah MT: Mechanisms involved in the protective effect of estradiol-17 β on lipid peroxidation and DNA damage. *Part. Am J Physiol* 1998, **274**:1002–1008.
33. Harris-White ME, Chu T, Miller SA, Simmons M, Teter B, Nash D, Cole GM, Frautschy SA: Estrogen (E2) and glucocorticoid (Gc) effects on microglia and A β clearance *in vitro* and *in vivo*. *Neurochem Int* 2001, **39**(5–6):435–448.
34. Paxinos G, Watson C: *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 2nd edition. San Diego California: Academic Press INC; 1986.
35. Reyes-Guerrero G, Vázquez-García M, Elías-Viñas D, Donatti-Albarrán OA, Guevara-Guzmán R: Effects of 17 β -estradiol and extremely low-frequency electromagnetic fields on social recognition memory in female rats: A possible interaction? *Brain Res* 2006, **1**:131–138.
36. Larrazolo-López A, Kendrick KM, Aburto-Arciniega M, Arriaga-Ávila V, Morimoto S, Frías M, Guevara-Guzmán R: Vagino-cervical stimulation enhances social recognition memory in rats via oxytocin release in the olfactory bulb. *Neurosci* 2008, **152**(3):585–593.
37. Clipperton-Allen AE, Lee AW, Reyes A, Devidz N, Phan A, Pfaff DW, Choleris E: Oxytocin, vasopressin and estrogen receptor gene expression in relation to social recognition in female mice. *Physiol Behav* 2012, **105**(4):915–924.
38. Paolini AG, McKenzie JS: Effects of lesions in the horizontal diagonal band nucleus on olfactory habituation in the rat. *Neuroscience* 1993, **57**(3):717–724.
39. Dember WN, Fowler H: Spontaneous alternation behavior. *Psychol Bull* 1958, **55**(6):412–428.
40. Lalonde R: The neurobiological basis of spontaneous alternation. *Neurosci Biobehav Rev* 2002, **26**(1):91–104.
41. Wesson DW, Levy E, Nixon RA, Wilson DA: Olfactory dysfunction correlates with amyloid-beta burden in an Alzheimer's disease mouse model. *J Neurosci* 2010, **30**(2):505–514.
42. Pike CJ, Burdick D, Walencewicz AJ, Glabe CG, Cotman CW: Neurodegeneration induced by A- β myloid peptides *in vitro*: the role of peptide assembly state. *J Neurosci* 1993, **13**(4):1676–1687.
43. Selkoe DJ: Alzheimer's disease: genes, protein and therapy. *Physiol Rev* 2001, **81**(2):741–766.
44. Lois C, Alvarez-Buylla A: Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science* 1994, **264**:1145–1148.
45. Danielyan L, Schäfer R, Von Arnim-Mayerhofer A, Buadze M, Geisler J, Klopfer T, Burkhardt U, Proksch B, Verleysdonk S, Ayturan M, Buniatian GH, Gleiter CH, Frey WH 2nd: Intranasal delivery of cells to the brain. *Eur J Cell Biol* 2009, **88**(6):315–324.
46. Kogan JH, Frankland PW, Silva AJ: Long-term memory underlying hippocampus-dependent social recognition in mice. *Hippocampus* 2000, **10**(1):47–56.
47. Eichenbaum H: Hippocampus: cognitive processes and neural representations that underlie declarative memory. *Neuron* 2004, **44**(1):109–120.
48. Levy DA, Hopkins RO, Squire LR: Impaired odor recognition memory in patients with hippocampal lesions. *Learn Mem* 2004, **11**(6):794–796.
49. Kesner RP, Hunsaker MR, Ziegler W: The role of the dorsal and ventral hippocampus in olfactory working memory. *Neurobiol Learn Mem* 2011, **96**(2):361–366.
50. Sánchez-Andrade G, Kendrick KM: The main olfactory system and social learning in mammals. *Behav Brain Res* 2009, **200**(2):323–335.
51. Wang X, Pal R, Chen XW, Limpeanchob N, Kumar KN, Michaelis EK: High intrinsic oxidative stress may underlie selective vulnerability of the hippocampal CA1 region. *Mol Brain Res* 2005, **140**(1–2):120–126.
52. Kowall NW, McKee AC, Yankner BA, Beal MF: *In vivo* neurotoxicity of beta-amyloid [β (1–40)] and the β (25–35) fragment. *Neurobiol Aging* 1992, **13**(5):537–542.
53. Stepanichev MY, Zdobnova IM, Zarubenko II, Moiseeva YV, Lazareva NA, Onufriev MV, Gulyaeva NV: Amyloid- β (25–35)-induced memory impairments correlate with cell loss in rat hippocampus. *Physiol Behav* 2004, **80**(5):647–655.
54. Sigurdsson EM, Lee JM, Dong XW, Hejna MJ, Lorens SA: Laterality in the histological effects of injections of amyloid-beta 25–35 into the amygdala of young Fischer rats. *J Neuropathol Exp Neurol* 1997, **56**(6):714–725.
55. Stark G: Functional consequences of oxidative membrane damage. *J Membr Biol* 2005, **205**(1):1–16.
56. Jenner P, Olanow CW: Understanding cell death in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 1998, **44**(3 suppl 1):72–84.
57. Rivas-Arancibia S, Dorado-Martínez C, Colin-Barenque L, Kendrick KM, De la Riva C, Guevara-Guzmán R: Effect of acute ozone exposure on locomotor behavior and striatal function. *Pharmacol Biochem Behav* 2003, **74**(4):891–900.
58. Guevara-Guzmán R, Arriaga V, Kendrick KM, Bernal C, Vega X, Mercado-Gómez OF, Rivas-Arancibia S: Estradiol prevents ozone-induced increases in brain lipid peroxidation and impaired social recognition memory in female rats. *Neuroscience* 2009, **159**(3):940–950.
59. Sharp FR, Liu J, Bernabeu R: Neurogenesis following brain ischemia. *Brain Res Dev Brain Res* 2002, **134**(1–2):23–30.
60. Butterfield DA, Reed T, Newman SF, Sultana R: Roles of amyloid β -peptide-associated oxidative stress and brain protein modifications in the pathogenesis of Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Free Radic Biol Med* 2007, **43**(5):658–677.
61. Limón ID, Mendieta L, Díaz A, Chamorro G, Espinosa B, Zenteno E, Guevara J: Neuroprotective effect of alpha-asarone on spatial memory and nitric oxide levels in rats injected with amyloid-beta ((25–35)). *Neurosci Lett* 2009, **453**:98–103.
62. Sharp FR, Liu J, Bernabeu R: Neurogenesis following brain ischemia. *Dev Brain Res* 2002, **134**(1–2):23–30.

63. Schmued LC, Albertson C, Slikker W Jr: **Fluoro-Jade: a novel fluorochrome for the sensitive and reliable histochemical localization of neuronal degeneration.** *Brain Res* 1997, **751**(1):37–46.
64. Wharton W, Gleason CE, Lorenze KR, Markgraf TS, Ries ML, Carlsson M, Asthana S: **Potential role of estrogen in the pathobiology and prevention of Alzheimer's disease.** *Am J Trans Res* 2009, **1**(2):131–147.
65. Henderson VW, Brinton RD: **Menopause and mitochondria: windows into estrogen effects on Alzheimer's disease risk and therapy.** *Prog Brain Res* 2010, **182**:77–96.
66. Craig MC, Murphy DG: **Estrogen therapy and Alzheimer's dementia.** *Ann N Y Acad Sci* 2010, **1205**:245–253.
67. Yue X, Lu M, Lancaster T, Cao P, Honda S, Staufenbiel M, Harada N, Zhong Z, Shen Y, Li R: **Brain estrogen deficiency accelerates Abeta plaque formation in Alzheimer's disease animal model.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, **102**(52):19198–19203.
68. Wang JM, Irwin RW, Brinton RD: **Activation of estrogen receptor α increases and estrogen receptor β decreases apolipoprotein E expression in hippocampus *in vitro* and *in vivo*.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, **103**:16983–16988.

doi:10.1186/1471-2202-14-104

Cite this article as: Bernal-Mondragón *et al.*: Estradiol prevents olfactory dysfunction induced by A- β 25–35 injection in hippocampus. *BMC Neuroscience* 2013 **14**:104.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit

