



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**EFFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE CITRULINA EN EL DÉFICIT COGNITIVO
ASOCIADO A LA PROGRESIÓN DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER EN UN
MODELO MURINO**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS**

PRESENTA:

M. EN C. MARTÍNEZ GONZÁLEZ KATIA LETICIA

TUTOR PRINCIPAL: DRA. PAOLA GARCÍA DE LA TORRE
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. GIL ALFONSO MAGOS GUERRERO
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

DR. JOSÉ FERNANDO PEÑA ORTEGA
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. , NOVIEMBRE, 2021.



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.

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

OFICIO CPCB/1083/2021

ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **30 de agosto de 2021** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la estudiante **MARTÍNEZ GONZÁLEZ KATIA LETICIA** con número de cuenta **304157105** con la tesis titulada **“EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE CITRULINA EN EL DÉFICIT COGNITIVO ASOCIADO A LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER EN UN MODELO MURINO”**, realizada bajo la dirección de la **DRA. PAOLA GARCÍA DE LA TORRE**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DR. FEDERICO BERMÚDEZ RATTONI
Vocal: DRA. GOHAR GEVORGYAN
Vocal: DRA. DIANA BARRERA OVIEDO
Vocal: DRA. ALICIA ELIZABETH HERNÁNDEZ ECHEAGARAY
Secretario: DR. GIL ALFONSO MAGOS GUERRERO

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 16 de noviembre de 2021

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



AGRADECIMIENTOS:

Agradezco al **Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM** por brindarme el apoyo para continuar con mi formación académica y otorgarme las herramientas para reforzar mis conocimientos y experiencias.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)** por otorgarme la beca de posgrado para apoyar mi permanencia y conclusión del doctorado (número de becario **536810**).

Al **Programa para Formación de Investigadores de la División de Desarrollo de la Investigación** de la Coordinación de Investigación en Salud del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), por el apoyo recibido para la realización de este trabajo con número de registro (FIS/IMSS/PROT/G17-2/1754).

A los miembros de mi comité tutor:

Dr. Fernando Peña Ortega, por sus propuestas y observaciones para mejorar mi trabajo, así como las críticas al mismo que ayudaron a su conclusión.

Dr. Gil Alfonso Magos Guerrero, por brindarme su apoyo en el seguimiento de este trabajo, sus observaciones y por sus contribuciones para la conclusión del mismo.

Agradecimientos a título personal:

A la Dra. Paola García de la Torre, mi tutora, por dirigir este proyecto y transmitirme todos sus conocimientos para mi óptimo desarrollo durante el doctorado, además de la ayuda en la búsqueda de herramientas para mejorar este proyecto. Gracias Dra. Paola por tolerarme y brindarme tu apoyo y comprensión en todo momento y en cada una de las circunstancias que experimenté durante estos años, gracias por brindarme la confianza para ser parte de tu equipo de trabajo y gracias por tu contribución para mi formación como investigadora.

Al Dr. Gil Alfonso Magos Guerrero, por sus consejos, cuestionamientos y sugerencias para mejorar y finalizar este trabajo.

Al Dr. Fernando Peña Ortega, por sus comentarios y aportaciones para el enriquecimiento de este trabajo.

Al Dr. Federico Bermúdez Rattoni por su valiosa contribución a mi formación como investigadora, mediante sus comentarios y correcciones a la tesis y por ser parte de mi desarrollo profesional desde la licenciatura.

Al Dra. Gohar Gevorgyan por sus apreciables comentarios y sugerencias para mejorar este proyecto de investigación mediante sus sugerencias y correcciones durante mi candidatura y ahora en mi tesis.

A la Dra. Elizabeth Hernández Echeagaray por sus valiosas aportaciones a este trabajo escrito.

A la Dra. Diana Barrera Oviedo por sus correcciones al escrito de la tesis, por tomarse el tiempo de revisar a detalle y corregirlo para de esta manera mejorarlo.

A la M. en C. Azul Islas Hernández por su cooperación en el mantenimiento de la colonia de ratones para mis experimentos y por todos los momentos divertidos que pasamos juntas.

A mis compañeros de laboratorio, Vinni, Mónica, Rodrigo al Químico David y a Josué por sus consejos y apoyo en la realización de este trabajo, además de los amenos momentos que me hicieron pasar durante mi estancia en el laboratorio.

DEDICATORIAS:

A mi madre por ser un ejemplo de fortaleza e inteligencia, porque siempre esta cerca cuando la necesito y evita que cree una tragedia de cada evento desafortunado que vivo, por sus consejos y por ser mi maestra de vida.

A mi padre por todo el apoyo que me ha brindado para llegar hasta donde estoy, por ser un ejemplo de trabajo, responsabilidad y perseverancia.

A mi hermano Manuel por todo el apoyo, consejos, motivación y todos los momentos divertidos que compartimos, me transmites paz y seguridad cuando estamos juntos.

A mi hermano Daniel, mi compañero de aventuras, por las discusiones, la peleas y todos los buenos momentos, porque todo eso nos hace crecer y aprender juntos y sin ti mi vida sería muy solitaria y aburrida.

A Christian Hernández Sierra, por tu amistad sincera, por tu paciencia y amor, gracias por ser esa persona que siempre está y por ayudarme en la búsqueda de una mejor versión de mi misma.

A mis amigos: Manuel Mendoza, Giovanni Hernández, Melbi Ramos, por la convivencia y los buenos momentos compartidos.

Índice

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
MARCO TEÓRICO	5
1 Enfermedad de Alzheimer	5
1.1 Definición	6
1.2 Antecedentes históricos	6
1.3 Patología de la enfermedad.....	7
2 Metabolismo y Enfermedad de Alzheimer	8
2.1 Aminoácidos en Enfermedad de Alzheimer	9
3 Citulina	12
3.1 Óxido nítrico	15
3.2 Suplementación con citrulina	17
3.3 Citrulina en envejecimiento.....	18
4 Modelos murinos.....	22
4.1 Modelo Murino Triple Transgénico de Alzheimer.....	23
5 Justificación	25
Planteamiento del problema	26
6 Hipótesis	27
7 Objetivo general	27
Objetivos particulares.....	27
8 Metodología	28
Animales	28
Administración citrulina / agua.....	31
Laberinto Acuático de Morris	31
Extracción de Líquido Cefalorraquídeo.....	32
Eutanasia y extracción de estructuras	32
Detección de arginina por UPLC	33
Determinación de nitritos.....	34
Determinación de Radical OH.....	34
9 Resultados	37
Memoria	37
Niveles de Arginina	56
Niveles de Óxido Nítrico.....	60
Niveles de Radical OH	64
10 Discusión.....	66
11 Conclusiones	78
Referencia Bibliográfica.....	80
ANEXO: Artículo requisito para obtener el grado.....	90

**Efecto de la administración de citrulina en el déficit cognitivo asociado a la progresión de la
Enfermedad de Alzheimer en un modelo murino.**

RESUMEN

ANTECEDENTES: La enfermedad de Alzheimer (EA) es la causa más común de demencia, ya que abarca entre el 50 y el 70% de los casos. El mayor factor de riesgo para padecer la EA es el incremento de la edad, conforme crece la esperanza de vida crece exponencialmente el riesgo de padecerla, y en los países con niveles de ingresos bajos y medios se presentan más casos.

En los últimos años, la comprensión de los mecanismos moleculares y celulares implicados en la patogenia de esta enfermedad neurodegenerativa poligénica ha mejorado pero aún no está del todo esclarecida. Existen numerosas y complejas cascadas de alteraciones que interactúan secuencialmente, con las cuales se intenta explicar los mecanismos patológicos de la EA. Una hipótesis sugerida es la de la cascada amiloidea que lleva a la acumulación de placas con la isoforma del péptido beta amiloideo de 42 aminoácidos de longitud, que además de ser el componente mayoritario de las placas seniles, se considera una isoforma neurotóxica. También se ha descrito el depósito de ovillos neurofibrilares intraneuronales producidos por la hiperfosforilación de la proteína TAU y procesos posteriores como la neuroinflamación generalizada. Ambas cascadas, beta amiloidea y ovillar, inducen degeneración axonal e interrupción de la integridad sináptica, lo que a su vez conduce a una disfunción sináptica y en última instancia al deterioro cognitivo. Se ha propuesto verla como una enfermedad metabólica mediada por resistencia cerebral a la insulina y al factor de crecimiento insulínico tipo 1. También han sido observados cambios metabólicos en modelos murinos con la EA en donde se han reportado cambios en niveles de las poliaminas, de algunos aminoácidos esenciales, en aminoácidos de cadena ramificada (BCAAs), en los niveles de serotonina y en la homeostasis de fosfolípidos. Deficiencia de arginina, un precursor del óxido nítrico también ha sido reportada en pacientes con enfermedad de Alzheimer. Generalmente, los cambios patológicos en el cerebro preceden a los cambios en metabolitos de la sangre en esta enfermedad. El seguimiento de todos los cambios bioquímicos durante la EA, así como la relación entre los mecanismos de la enfermedad y algunos procesos metabólicos, permitirá el desarrollo de estrategias terapéuticas. Algunos trabajos de investigación se han centrado en el papel de los niveles de algunos aminoácidos durante la EA e incluso han propuesto la suplementación con algunos de ellos para revertir o detener el deterioro cognitivo en la enfermedad. Hasta ahora la suplementación con aminoácidos se ha realizado en modelos animales en envejecimiento y los resultados han sido favorables, un ejemplo de esto es un trabajo en el que una dieta rica en citrulina (3 meses) generó cambios en los patrones de las balsas lipídicas en ratas envejecidas, ayudando así a una disminución de la producción de la proteína precursora de amiloide, lo cual indica que la citrulina disminuyó los cambios en balsas lipídicas asociados al

envejecimiento en estos animales, dejando un patrón de balsas lipídicas parecido al que presentan los animales jóvenes. Se ha reportado que los niveles de arginina del líquido cefalorraquídeo disminuyen en el adulto mayor así como en pacientes con demencia multi-infarto. Algunos estudios reportan que la vía metabólica de la arginina se encuentra implicada en el desarrollo de la EA. Al respecto, citrulina se ha propuesto como un preventivo de la disfunción vascular dado que se considera un sustituto de la terapia con arginina esto debido a que arginina en dosis altas causa malestar gástrico y es susceptible de degradación por el hígado, lo cual reduce su disponibilidad a nivel sistémico; ambos fenómenos no suceden con la administración de citrulina.

OBJETIVOS: Evaluar el efecto de la administración de citrulina en la progresión de la enfermedad de Alzheimer mediante cambios en la memoria espacial, así como cambios en las concentraciones de arginina y óxido nítrico en líquido cefalorraquídeo e hipocampo, en un modelo murino para esta enfermedad.

MATERIAL Y MÉTODOS: Después de la administración de citrulina durante 3 meses, la memoria espacial de los animales fue evaluada mediante el laberinto acuático de Morris. Posteriormente, se obtuvo líquido cerebroespinal mediante una punción en la cisterna magna para detectar, mediante HPLC, las concentraciones de L-arginina. Se midieron además los niveles de arginina y óxido nítrico en homogenados de hipocampo después del tratamiento en ambos grupos experimentales (citrulina y control).

RESULTADOS: Los animales 3xTgAD machos de 8 meses de edad que fueron administrados con citrulina durante tres meses tienen un mejor desempeño conductual en la tarea espacial de Laberinto Acuático de Morris. Los niveles de arginina después de la administración de citrulina incrementaron en líquido cefalorraquídeo, sin embargo no se observaron cambios en los niveles de arginina en tejido (hipocampo) y observamos una tendencia al incremento en los niveles de NO en tejido.

CONCLUSIONES: La administración oral de citrulina podría ser un adyuvante para mejorar la memoria en etapas tempranas de la enfermedad, poniendo al óxido nítrico como un blanco de interés viable en la investigación para aminorar el déficit cognitivo en la EA.

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is the most common cause of dementia and consists of progressive neurodegeneration characterized by initial memory impairment and cognitive decline. Amyloid and tangle pathologies are specific to AD, and although its precise etiology is still unclear, cardiovascular risk factors (e.g., hypertension, hypercholesterolemia, diabetes mellitus, aging, and sedentary lifestyle) are associated with a higher incidence of AD. At this time, evidence suggests that chronic brain hypoperfusion and cerebrovascular pathology are the earliest clinical markers of AD. Some studies support the hypothesis that AD correlates with the dysfunction of metabolic pathways that are translated into neurological symptoms. In this regard, changes in bioenergetics are part of the normal aging process and even when body-wide, these anomalies affect the brain most substantially because of its exceptionally high-energy requirements. In AD, changes in the glycolysis pathway, a decrease in oxidative metabolism, diminished mitochondrial potential, defective or reduced mitochondria, and insulin-like growth factor 1/insulin resistance have been reported. New metabolomic and lipidomic studies have analyzed changes in the postmortem brains of patients with AD. Some studies implicated the L-arginine (L-Arg) metabolic pathway in the development of AD. Different metabolomic studies suggest that amino acid levels vary greatly in AD, with arginine being one of the most interesting ones because a reduction in this amino acid can affect the citrulline/nitric oxide (NO) pathway. Studies in a rodent model of AD show similar results pointing to a dysregulation of the L-Arg metabolism.

Arginine is a semi-essential amino acid in humans that, under certain physiologic conditions with a high demand for arginine, may become essential, and is required for NO, creatine, polyamine, and protein synthesis. Arginine and citrulline concentrations are lower in the cerebrospinal fluid of patients with AD. However, some studies did not show any changes in the arginine levels of patients with AD or the levels were elevated compared with those of patients with mild cognitive impairment.

Geriatric patients with cerebrovascular disease who are treated with oral L-Arg have been shown to improve their cognitive function and reduce their levels of lipid peroxidation. Furthermore, the intracerebroventricular administration of L-Arg has recently been reported to improve spatial memory acquisition of 6.5 month old female 3xTgAD mice with AD.

NO has been shown to be biologically active in the central nervous system and is involved in learning processes and cognitive function, because NO helps regulate synaptic plasticity and contributes to long-term potentiation and depression. Deficiency of NO has been implicated in neurodegeneration by promoting endothelial dysfunction, accelerating formation and accumulation of amyloid peptides, reducing synaptic plasticity, activating microglia, and evoking neuroinflammation.

Citrulline is a precursor of L-Arg, which is oxidized to NO and citrulline by the action of endothelial NO synthase (NOS). The exogenous administration of L-Arg has been reported to restore NO bioavailability, and may offer a therapeutic strategy to control NO metabolism disorders and improve cardiovascular function.

Citrulline supplementation for 3 months reduced age-related hippocampus raft changes, resulting in raft patterns similar to those in young animals. All citrulline-treated rats had low levels of amyloid protein precursor (APP) and low levels of C99-APP-Cter, the first- step fragment of amyloidogenic APP. Citrulline has also been reported to protect against H₂ O₂ -induced hippocampal long-term potentiation (LTP) impairment, and aged rats fed with citrulline can reach a robust LTP, similar to the LTP recorded for younger rats. Citrulline has shown beneficial effects in various neurological diseases associated with oxidative stress, such as transient ischemic stroke.

Objectives: Alzheimer's disease (AD) correlates with the dysfunction of metabolic pathways that translates into neurological symptoms. An arginine deficiency, a precursor of nitric oxide (NO), has been reported for patients with AD. We aimed to evaluate the effect of citrulline oral supplementation on cognitive decline in an AD murine model.

Methods: Three-month citrulline or water supplementation was blindly given to male and female wild- type and 3×TgAD mice with AD trained and tested in the Morris water maze. Cerebrospinal fluid and brain tissue were collected. Ultra-performance liquid chromatography was used for arginine determinations and the Griess method for NO.

Results: Eight-month-old male 3×Tg mice with AD supplemented with citrulline performed significantly better in the Morris water maze task. Arginine levels increased in the cerebrospinal fluid although no changes were seen in brain tissue and only a tendency of increase of NO was observed.

Conclusions: Citrulline oral administration is a viable adjuvant for memory improvement in the early stages of AD, pointing to NO as a viable, efficient target for memory dysfunction in AD.

MARCO TEÓRICO

1. *Enfermedad de Alzheimer*

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la causa más común de demencia, es una enfermedad caracterizada por la neurodegeneración progresiva del sistema nervioso central, que eventualmente lleva al declive gradual de la función cognitiva (Sisodia *et al.*, 2010). La EA fue descrita en 1906 por el psiquiatra alemán Alois Alzheimer en una mujer de 50 años, por lo que en su momento se consideró una demencia presenil. Sin embargo, en la actualidad, la mayoría de los casos diagnosticados como EA corresponden a pacientes de más de 65 años.

La EA como la mayoría de las enfermedades neurodegenerativas, presenta una forma familiar y una no-familiar o esporádica (Sisodia *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 2011). En 2015 el World Alzheimer's Report publicó la estimación de 46 millones personas con demencia en el mundo y en ese mismo reporte se estimó que la cifra aumentaría a 131.5 millones para el año 2050. Además, mostró una estimación por continentes en la cual el continente americano presentaba 9.4 millones de casos; en 2019 la estimación fue de más de 50 millones de personas en el mundo que vivían con demencia y se estimó que esa cifra aumentaría a 152 millones para el año 2050.

Específicamente de México se sabe que es un país cuya población está envejeciendo, mostrando una transformación radical en su pirámide de base ancha que significaba una población joven mayoritaria y que va a paso acelerado hacia un rectángulo, es además uno de los países latinoamericanos con mayor prevalencia (7.3%) y una incidencia de 27.3 (1000 personas/año) que presenta enfermedad de Alzheimer. Estudios en población mexicana han determinado que hay un mayor número de mujeres con EA y el riesgo de padecerla se incrementa con la presencia del síndrome metabólico, la enfermedad cardiovascular y la depresión. La proyección del número de mexicanos afectados por la enfermedad de Alzheimer para el 2050 alcanzará la cifra de más de 3.5 millones (Instituto Nacional de Geriátrica 2014).

1.1 Definición

La EA es una enfermedad multifactorial, definida por la neurodegeneración progresiva e irreversible del sistema nervioso central que eventualmente lleva al declive gradual de la función cognitiva; es la causa más común de demencia en la población de edad avanzada (Czech *et al.*, 2000; Oddo *et al.*, 2003).

Entre los factores de riesgo de la EA se encuentra la vulnerabilidad genética debida a polimorfismos entre determinados grupos de sujetos (Maccioni *et al.*, 2009). También existen antecedentes como traumatismos cráneo-encefálicos, una dieta rica en grasas, alteraciones en la homeostasis del colesterol, deficiencias de vitamina B12, cambios en la respuesta inmune (infecciones recurrentes) (Rojo *et al.*, 2006), un incremento del estrés oxidativo (sobrecarga de hierro redox en el cerebro), activación de las células gliales, anormalidades proteicas, alteraciones sinápticas y factores neurotóxicos (Lavados *et al.*, 2008) que incrementan el riesgo de desarrollar la EA.

1.2 Antecedentes históricos

Identificada por primera vez en 1886 por el neuropsiquiatra y neuropatólogo Bernhard von Gudden, en el rey de Bavaria Ludwig II que padecía una enfermedad mental, Bernhard escribió un reporte del caso mientras se hacia cargo del cuidado del rey, dicho reporte posteriormente influyó en el trabajo de Alois Alzheimer.

El psiquiatra alemán Alois Alzheimer describió nuevos marcadores patológicos (neurofibrillas y placas seniles) de un concepto de demencia antiguo y en 1907 publicó la descripción clínico patológica de la señora Auguste D., una mujer de 50 años, a pesar de que en su momento se consideró una demencia presenil (45 a 65 años de edad). Alzheimer realizó el estudio histológico del cerebro de esta paciente y puntualizó las características neuropatológicas de esta enfermedad por primera vez, describiendo las placas seniles y ovillos neurofibrilares (Sisodia, S.S. y Tanzi R.E., 2010).

Existe controversia al respecto de las descripciones que algunos autores hicieron antes que las del doctor Alzheimer. Cinco meses antes que Alzheimer, Fuller relacionó la demencia senil con la presencia de neurofibrillas. Desde 1887 ya existían reportes en los que se relacionaba a estas placas con demencia.

En 1907, Fisher realizó un estudio clínico-patológico de 12 pacientes en el que relacionó también las placas seniles con la demencia. Sin embargo, se atribuyó a Alois Alzheimer esta primera descripción y de ahí el nombre de la enfermedad.

En la actualidad, la mayoría de los casos con diagnóstico de EA corresponden a pacientes de más de 70 años, con lo cual se puede señalar que se trata de EA esporádica (EAE) (Sisodia, S.S. y Tanzi R.E., 2010), asociada principalmente al envejecimiento (Zhu H., *et al.*, 2011).

1.3 Patología de la enfermedad

La EA se caracteriza por dos lesiones principales: placas neuríticas difusas, compuestas principalmente por el péptido β -amiloide₁₋₄₂ y ovillos neurofibrilares, compuestos de agregados filamentosos de la proteína tau hiperfosforilada. Las placas neuríticas derivan del rompimiento proteolítico de la proteína precursora de amiloide (APP) por la acción de las secretasas beta y gamma (ver Figura 1) y se encuentran principalmente en las cortezas del sistema límbico y cortezas asociadas. Son focos microscópicos de deposiciones extracelulares de β -amiloide₁₋₄₂ asociadas a daño axonal y dendrítico.

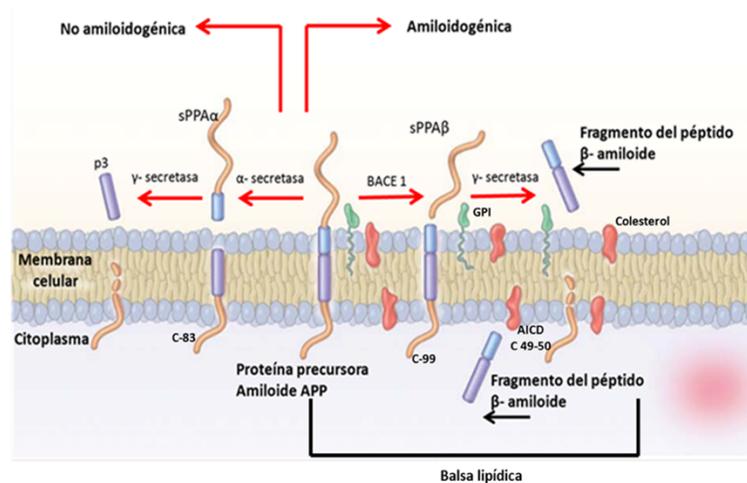


Figura 1. Modificado de Querfurth y Laferla 2010.

Corte de la α -secretasa a la secuencia del péptido β -amiloide ($A\beta$), con lo cual se inicia la cascada no amiloidogénica. Un ectodominio largo de la proteína precursora amiloide es liberado ($sAPP\alpha$) dejando atrás un fragmento carboxilo terminal de 83 aminoácidos (C83), el cual es digerido por la γ -secretasa, liberando un dominio extracelular p3 y un dominio intracelular amiloide (AICD). En la cascada amiloidogénica por el contrario la enzima que corta primero es la β -secretasa (BACE-1), liberando un fragmento más corto ($sAPP\beta$). El fragmento liberado carboxilo terminal de 99 aminoácidos es posteriormente cortado por la γ -secretasa y genera el fragmento ($A\beta$) y el fragmento AICD. La escisión de la γ -secretasa ocurre dentro de la membrana celular en un proceso único denominado "proteólisis membranosa". $sAPP\alpha$ y $sAPP\beta$ son fragmentos de APP secretados después de escisiones de α -secretasa y β -secretasa, respectivamente. AICD es una cola corta (aproximadamente 50 aminoácidos) que se libera en el citoplasma después de escisiones progresivas de ϵ -a- γ por la γ -secretasa. AICD se transporta al núcleo, lo que inicia la activación de la transcripción.

Los ovillos neurofibrilares se forman cuando la proteína Tau es fosforilada en múltiples sitios y debido a esto pierde su afinidad por los microtúbulos separándose y agregándose principalmente en el citoplasma perinuclear de neuronas de regiones como el hipocampo, la amígdala o la corteza entorrinal (Selkoe D.J, 2001).

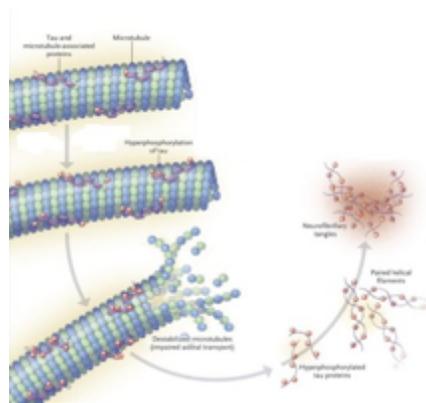


Figura 2. Modificado de Querfurth y Laferla 2010.

Tau estructura y función. La fosforilación normal de Tau ocurre en los residuos de serina y treonina. Cuando estos residuos están seguidos de prolina estos aminoácidos son fosforilados por la cinasa sintasa glicógeno, una cinasa dependiente de ciclina (cdk5) y su subunidad activadora p25 o la proteína cinasa activadora de mitogeno (MAPK). Sitios específicos hiperfosforilados de filamentos helicoidales pareados de la proteína Tau en la enfermedad de Alzheimer tienden a estar flanqueados por el dominio de unión a microtúbulos (MBD) de Tau. La unión de Tau promueve el ensamblaje de los microtúbulos y su estabilidad. Actividad excesiva de las cinasas, así como actividad reducida de las fosfatasas o ambas causa hiperfosforilación de Tau pérdida del ensamblaje y auto-agregación, además de desestabilizar los microtúbulos.

2. **Metabolismo y Enfermedad de Alzheimer**

Durante la enfermedad de Alzheimer ocurren cambios metabólicos relacionados con la fisiología y señalización celular, no se ha determinado si estos cambios preceden o son consecuencia de la enfermedad y han sido reportados como factores de riesgo. La etiología de esta enfermedad no es aún clara, sin embargo, existen factores de riesgo cardiovasculares tales como la hipertensión, hipercolesterolemia, diabetes mellitus, el envejecimiento y un estilo de vida sedentario que han sido asociados con una alta incidencia en pacientes con esta enfermedad (Austin SA. *et al.*, 2010; Bourasset F., *et al.*, 2009). Algunos estudios sostienen la hipótesis de que la EA correlaciona con la disfunción de vías metabólicas lo cual se traslada a síntomas neurológicos (Cai H., *et al.*, 2012). En consonancia con estas hipótesis, se ha visto que existen cambios en la bioenergética como un proceso normal que ocurre durante el envejecimiento, lo cual

afecta principalmente al cerebro debido a los altos requerimientos energéticos de este órgano (Maccioni *et al.*, 2009).

La Bioenergética es el metabolismo de varias moléculas combustibles para producir y utilizar energía a través de la glicólisis, la respiración mitocondrial (fosforilación oxidativa) o la vía fosfato pentosa (PPP) (Sonntag *et al.*, 2017). La acumulación de anormalidades en el balance de glucosa/lactato en combinación con el daño mitocondrial en neuronas puede tener como consecuencia muchos eventos celulares de senescencia y neurodegeneración, los cuales pueden incluir la iniciación y progresión de la EA (Demetrius *et al.*, 2014). Además, se han observado cambios en la vía de glicólisis, decremento de metabolismo oxidativo, disminución del potencial mitocondrial y resistencia al factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1) (Rojo *et al.*, 2006).

2.1 Aminoácidos en enfermedad de Alzheimer

Relacionado con cambios en la bioenergética que se presentan durante el envejecimiento se ha demostrado que cuando las neuronas no pueden realizar el catabolismo de la glucosa de manera eficiente, como ocurre durante la EA, realizan un proceso de oxidación de aminoácidos para producir energía. Si los aminoácidos neuronales disminuyen o si la maquinaria empleada para su metabolismo se desregula, las neuronas pueden morir, contribuyendo con esto a la progresión de la enfermedad (Griffin y Bradshaw, 2017).

Varios estudios han demostrado alteraciones en los niveles de aminoácidos en suero y cerebro de pacientes con EA o en modelos animales. Sin embargo, aún no se ha establecido si estos cambios contribuyen o no a la patogénesis de la enfermedad (Griffin y Bradshaw, 2017). En general casi todos los aminoácidos se encuentran significativamente reducidos en pacientes con EA comparados con los controles (Hurtado *et al.*, 2018). Los aminoácidos libres tienen importancia en la neurotransmisión, en la función de receptores y han sido implicados en la neurotoxicidad, cambios en estos aminoácidos pueden ser un indicador de neurodegeneración en EA.

Ejemplo de esta investigación realizada en niveles de aminoácidos está el trabajo de Fonteh y colaboradores que determinaron los cambios en la concentración de aminoácidos libres y dipéptidos en pacientes con

probable EA (estos pacientes mostraron una historia clínica de demencia progresiva de más de 12 meses de duración, con daño en la memoria en más de dos áreas relacionadas con la cognición y el inicio de la enfermedad se encontraba entre las edades de 40 y 90 años), para esto, emplearon los métodos de cromatografía líquida y espectrofotometría de masas. Las concentraciones de aminoácidos libres y dipéptidos fueron medidos en líquido cefalorraquídeo, plasma y orina de los pacientes control y de los pacientes con probable EA; los resultados obtenidos indican que los aminoácidos libres arginina y citrulina, involucrados en el metabolismo de la urea y la síntesis del óxido nítrico (NO por sus siglas en inglés), mostraron concentraciones ligeramente bajas en líquido cefalorraquídeo de los pacientes y plasma con probable EA la concentración de aminoácidos arginina, citrulina y ornitina fue mayor en orina de estos pacientes, comparados con los controles. Estos cambios en arginina y citrulina podrían deberse a cambios en la detoxificación de nitrógeno (Fonteh *et al.*, 2007). Resultados similares fueron obtenidos por Samakashvili y colaboradores, ellos reportaron disminución en los niveles de arginina en líquido cefalorraquídeo de pacientes con enfermedad de Alzheimer comparados con pacientes control, pacientes con deterioro cognitivo leve que permaneció estable y pacientes con deterioro cognitivo leve con progresión hacia enfermedad de Alzheimer en estos cuatro grupos se observó una disminución de los niveles del aminoácido arginina dependiente de la progresión siendo los pacientes con enfermedad de Alzheimer los que presentaron los niveles más bajos de arginina (Samakashvili *et al.*, 2011). Ibañez y colaboradores encuentran una tendencia similar en los niveles del aminoácido arginina, observaron una ligera reducción en muestras de líquido cefalorraquídeo de pacientes con enfermedad de Alzheimer (Ibañez *et al.*, 2012).

En otro trabajo de Molina y colaboradores se midieron los niveles de 21 aminoácidos en líquido cefalorraquídeo y 24 aminoácidos en plasma dentro de los cuales se encontraban citrulina y arginina, en pacientes con EA y en controles de la misma edad, al igual que en el trabajo anterior, ellos encontraron una disminución en los niveles de citrulina en líquido cefalorraquídeo en pacientes con EA comparados con los controles de la misma edad, pero, a diferencia de Fonteh y colaboradores ellos encontraron incremento en los niveles de arginina en líquido cefalorraquídeo y aumento en los niveles de citrulina en plasma (Molina *et al.*, 1998).

Otros estudios han analizado los cambios metabólicos en pacientes con deterioro cognitivo leve, EA y en controles de la misma edad y encontraron que los metabolitos dimetilarginina, arginina, valina, prolina, serina, histidina, colina, creatina, carnitina y suberilglicina podrían ser posibles biomarcadores de la progresión de esta enfermedad (Ibáñez *et al.*, 2012). En otro estudio metabólico realizado en plasma de pacientes con deterioro cognitivo leve y pacientes con EA se encontró que el metabolismo de arginina y las poliaminas estaban alterados en los pacientes con EA (Graham *et al.*, 2015). Otro estudio demostró que las concentraciones de arginina en plasma de pacientes con EA se encontraban disminuidas al compararlas con sus controles de la misma edad; además, observaron una tendencia al incremento de los niveles de ADMA (dimetil-arginina-simétrica), importante inhibidor endógeno de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS por sus siglas en inglés), éste aumento podría conducir a la reducción en la producción de óxido nítrico que a su vez es un importante regulador cardiovascular, inmune y del sistema neuronal (Arlt *et al.*, 2012).

Contrario a estos cambios observados en algunos aminoácidos en pacientes probables o pacientes diagnosticados con la EA, también hay estudios en los que reportan que no hay cambios en las concentraciones de arginina en líquido cefalorraquídeo de pacientes con esta enfermedad comparados con controles de la misma edad (Mulder *et al.*, 2002). En otro estudio realizado por Kaiser y colaboradores, los niveles de aminoácidos como citrulina, arginina y ornitina se encontraron elevados en muestras de líquido cefalorraquídeo de pacientes con EA comparados con pacientes con deterioro cognitivo leve (Kaiser *et al.*, 2010).

En cuanto a los cambios en niveles de arginina en tejido cerebral también existen discrepancias; se ha encontrado disminución aproximadamente del 27% en nivel de arginina asociado a la enfermedad de Alzheimer en corteza temporal de pacientes con esta enfermedad (Gueli y Taibi, 2013). Como este trabajo existe otro realizado por Liu y colaboradores en el que reportan una disminución en los niveles de arginina en el giro frontal superior en pacientes con enfermedad de Alzheimer pero no encuentran diferencias en los niveles de este aminoácido en otras estructuras como el hipocampo y el cerebelo (Lui *et al.*, 2014). Contrario a estos resultados, Tarbit y colaboradores reportan un incremento en los niveles de arginina en hipocampo de pacientes con enfermedad de alzheimer (Tarbit *et al.*, 1980).

Otros estudios además han correlacionado la EA con disfunción de vías metabólicas, lo que se traslada a síntomas neurológicos. Estudios en metabolómica han analizado cambios post mortem en cerebro de pacientes con EA, algunos de estos estudios implican a la vía de L-arginina en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer, específicamente en el deterioro cognitivo observado durante la progresión de la enfermedad; esta asociación está basada en el papel de arginina en la vía de las óxido nítrico sintasas y la producción de óxido nítrico y la función del NO como regulador del flujo cerebral, en la respuesta inmune y en procesos neurológicos, como plasticidad sináptica; por ejemplo en la depresión a largo plazo (LTD por sus siglas en inglés) en el cerebelo y el estriado y en la potenciación a largo plazo (LTP por sus siglas en inglés) en estructuras como el hipocampo y la corteza (Arancio *et al*; 1996). Sin embargo como en muchas otras enfermedades neurodegenerativas aún no es posible establecer que estos cambios metabólicos sean la causa directa o sólo consecuencia de la enfermedad de Alzheimer.

La relación entre los cambios metabólicos y la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer aún no es ampliamente estudiada, ni entendida, no está claro aún cómo estas perturbaciones en el metabolismo están relacionadas con la severidad en la patología de la EA y con la expresión de los síntomas en individuos en riesgo de padecer la enfermedad.

3. **Citrulina**

Arginina es el precursor del NO, y a su vez tiene como precursor a citrulina. Citrulina es un aminoácido no proteico, semi-esencial, producido por el metabolismo de la glutamina intestinal y es el precursor para la síntesis de arginina *de novo* (Bahri *et al.*, 2012). Es producido de manera natural en el cuerpo y se puede encontrar en algunas frutas como la sandía (*Citrullus vulgaris*), de donde deriva el nombre (Moinard *et al.*, 2008). El aminoácido L-citrulina no está sujeto a la eliminación pre-sistémica, se convierte en L-arginina por la argininosuccinato-sintasa y por la argininosuccinato-liasa (Collins *et al.*, 2007).

L-citrulina ($C_6H_{13}N_3O_3$) tiene una masa molar de 175,19 g/mol. Es un ácido α -amino y existe en dos formas: citrulina libre, que es un producto de la familia de la enzima NOS; y citrulina que resulta de la modificación postraduccional de ciertas proteínas en residuos de arginina, que es catalizada por la peptidil-arginina

deaminasa (PAD). Se considera un aminoácido no proteico porque no puede ser incorporado en las proteínas durante el proceso de traducción, pero se encuentra en algunas proteínas debido a modificaciones postraduccionales (Curis *et al.*, 2005). Hay evidencia que sugiere que estas modificaciones pueden ser responsables de la activación inicial de la autoinmunidad, y se propone que la citrulinación es un proceso post traduccional asociado a la inflamación, es decir que se ha visto que ocurre con mayor frecuencia y de manera patológica cuando existe un proceso de inflamación, ya que está presente en muchos tejidos inflamatorios (Collins *et al.*, 2007).

La síntesis de citrulina depende principalmente de dos enzimas que corresponden a dos vías metabólicas en las cuáles está involucrada: la ornitina carbamoiltransferasa (OCT) y la NOS. Sólo la enzima arginosuccinato sintasa (ASS) es capaz de realizar el catabolismo de citrulina en mamíferos, y participa en ambas vías metabólicas antes mencionadas. La OCT es una de las enzimas que participan en el ciclo de la urea, ésta cataliza la conversión de ornitina en citrulina. Esta enzima también participa en el anabolismo de citrulina (vía de biosíntesis de arginina), donde citrulina es el producto (Baur *et al.*, 1987). En humanos la OCT se encuentra principalmente en el hígado y la mucosa intestinal (Takiguchi y Mori, 1995).

La otra vía de síntesis de citrulina es a través de las NOS esta reacción ocurre en todos tejidos, las tres enzimas NOS tienen expresión y localización en células neuronales (nNOS), en macrófagos (iNOS) y en células endoteliales (eNOS). Todas estas enzimas comparten un mecanismo para la síntesis de NO a partir de arginina con liberación de citrulina (Meulemans A., 2000).

Existe además un mecanismo de reciclamiento de citrulina durante el ciclo de la urea y las enzimas que participan son la arginosuccinato sintetasa (ASS) y la arginosuccinato liasa (ASL); a su vez el aminoácido citrulina que se produce en este ciclo puede ser usado como precursor de NO. Varios tipos de células que son capaces de metabolizar arginina en NO pueden tomar citrulina circulante (Raghavan y Dikshit, 2001).

El transporte de citrulina depende de transportadores no específicos de este aminoácido, puede ser transportado por transportadores genéricos de aminoácidos. Todas las células en el sistema nervioso tienen un sistema de transporte de citrulina. Se ha establecido que el sistema de transporte de aminoácidos L

puede ser un sistema implicado en el transporte de citrulina debido a que es un transportador no dependiente de sodio (Schmidlin *et al.*, 2000). Además de este transportador, el transportador de arginina también puede participar en la absorción de citrulina (Hilderman *et al.*, 2000).

La primera vía metabólica de citrulina es la biosíntesis de arginina, la cual involucra intercambios de citrulina en todo el cuerpo; arginina sintetizada a partir de citrulina representa el 60% de la síntesis de arginina de novo en el organismo, pero sólo del 5 al 15% de arginina circulante (Morris, 2000); la segunda vía metabólica es el ciclo del NO, el cual involucra reciclamiento local de citrulina; la tercera vía es el ciclo completo de la urea, el cual tiene lugar en el hígado. El hígado no puede tomar citrulina de la circulación, por esta razón citrulina es convertida en arginina por el riñón y liberada en la sangre para hacerla disponible para todo el cuerpo (Cynober *et al.*, 1995). Citrulina es un aminoácido no esencial en condiciones fisiológicas, la mayor parte de citrulina que se encuentra en la circulación proviene de la conversión de glutamina en los enterocitos, otros aminoácidos que actúan como precursores de citrulina son: glutamato, prolina y arginina bajo algunas circunstancias (Cynober, 2002).

En el cerebro las neuronas que producen NO no son capaces de reconvertir citrulina en arginina ya que éstas no expresan las enzimas ASS y ASL. El aminoácido citrulina es entonces liberado por las neuronas y tomado por células neuronales que se encuentran alrededor y en estas células se realiza la re-conversión a arginina. El aminoácido Arginina recién formada es liberado y tomado por las neuronas para formar más NO (Wiesinger, 2001).

3.1 Óxido nítrico

Ha sido reportado que arginina restablece la biodisponibilidad del NO (Lorin *et al.*, 2014). Cuando se realiza la administración aguda o crónica de arginina la producción de NO endotelial incrementa y mejora la función del endotelio, disminuyendo el riesgo de aterotrombosis (Vaugh *et al.*, 2001; Smith *et al.*, 2006) lo cual puede significar que arginina puede ser empleada como una estrategia terapéutica para controlar los desórdenes en el metabolismo del NO y mejorar la función cardiovascular (“Citrulline: From metabolism to therapeutic use,” 2013). El NO es un gas inodoro e incoloro por lo cual puede difundirse libremente a través de las membranas celulares. Es sintetizado a partir del aminoácido L-arginina con la participación de la enzima óxido nítrico sintetasa (NOS). Este proceso requiere de la participación de un agente reductor el NADPH (dinucleótido de nicotinamida y adenina fosfato), también de cofactores: dinucleótido de flavina y adenina (FAD), mononucleótido de flavina y adenina (FMN), tetrahidrobiopterina (H4B) y hierro protoporfirina IX (hemo) y son dependientes de calcio (Nathan,1992). La actividad de la NOS está regulada por arginina, oxígeno, calcio y otras sustancias necesarias para la síntesis del NO. En las células se han identificado 3 isoformas de NOS, dos de ellas, la endotelial (eNOS) y la neuronal (nNOS), están presentes en las células en todo momento por lo cual son denominadas constitutivas. La tercera isoforma es inducible (iNOS) y se expresa como respuesta a diferentes estímulos (Nathan, 1992; Feldman, 1993).

El NO se sintetiza en el endotelio vascular en respuesta a estímulos de sustancias que circulan en la sangre o cuando la presión sanguínea se eleva, esto hace que se inicie la síntesis del NO, en la que el NO se une a la enzima guanilato ciclasa y la activa. Esta enzima a su vez cataliza la formación de GMP cíclico (GMPC) a partir de GTP que actúa induciendo la vasodilatación. El resultado de la entrada de NO es, por tanto, la síntesis del mensajero intracelular GMPC. El NO también actúa en el sistema inmune, es sintetizado en leucocitos y su principal función es exterminar organismos fagocitados (Gaston *et al.*, 1993).

El NO está biológicamente activo en el sistema nervioso central; involucrado en procesos de aprendizaje y función cognitiva. (Hawkins, 1996); su participación ha sido demostrada en procesos de plasticidad sináptica (Dubey *et al.*, 2018), además de contribuir en los procesos biológicos de LTP y LTD (Liu *et al.*, 2019). La deficiencia de óxido nítrico ha sido implicada en neurodegeneración, varios estudios han demostrado la

asociación entre la patofisiología de la enfermedad de Alzheimer y los sistemas de NOS. Todas las isoformas de NOS están alteradas en la EA, lo cual podría indicar que el óxido nítrico tiene participación en la patología de esta enfermedad (Togo *et al.*, 2004; Domek-Łopacinska, K.U., Strosznajder, 2010).

Existe evidencia que indica que el NO endotelial tiene participación en la plasticidad sináptica en la corteza y el estriado (Haul *et al.*, 1999; Doreulee *et al.*, 2003). En la actualidad también ha sido demostrado que eNOS desempeña un papel en la modulación de la función sináptica en el hipocampo, que como se sabe, es la estructura cerebral que primero y con más severidad se ve dañada durante la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer (Katusic y Austin, 2014). Hopper y Garthwaite en 2006 demostraron que la producción de NO en el endotelio vascular es una señal requerida para la función sináptica hipocampal. Así mismo, la LTP es dependiente de la liberación de NO que es a su vez causada por la actividad de nNOS, así como de la liberación de NO proveniente de la actividad de eNOS (Hopper y Garthwaite, 2006). Tanto en LTP como en LTD, la transducción de señales del NO implica activación del receptor acoplado a guanilil ciclasa (NO_{GcR}), la acumulación de cGMP puede entonces activar a las proteínas cinasas para iniciar cascadas de fosforilación, lo que podría llevar la activación de factores de transcripción. Aunque también existen algunos efectos del NO independientes del cGMP que contribuyen a la plasticidad sináptica. En este trabajo se empleó un inhibidor de las NOS y con esto se produjo un bloqueo del LTP en cortes de hipocampo de ratas de 2 meses de edad, ellos postulan que este bloqueo podría ser revertido con la adición de un exceso de sustrato para la NOS o con la administración de bajas concentraciones de NO (Bon y Garthwaite, 2003). El papel del NO en la memoria ha sido demostrado en diferentes estudios realizados en modelos animales, por ejemplo en ratones deficientes de una de las óxido nítrico sintasas (eNOS por sus siglas en inglés) se demostró que estos animales deficientes de NO producido por la eNOS presentan incremento de β -amiloide en el cerebro y déficit de memoria (Hariharan *et al.*, 2019).

En contraste con arginina u ornitina, que inducen efectos secundarios gastrointestinales a dosis altas (>10 gramos), citrulina se reconoce como una sustancia segura para uso enteral o parenteral. La mayoría de los estudios han probado citrulina como un suplemento que puede sintetizar arginina *de novo* o como un precursor de NO (Bahri *et al.*, 2012; Moinard *et al.*, 2008). Hay pocos estudios de farmacocinética en

relación con este aminoácido intermedio. Collins y colaboradores utilizaron 7 g/día de arginina, mientras que Moinard y su grupo evaluaron desde 2.5 gr/día hasta 15 gr/día, ambos concluyeron que las dosis probadas son seguras y no tienen efectos colaterales (Moinard *et al.*, 2008; Collins *et al.*, 2007).

3.2 Suplementación con citrulina

Citrulina puede emplearse como una forma enmascarada de arginina que, al no ser metabolizada en el hígado, incrementa los niveles de arginina de una manera más eficiente, razón por la cual citrulina es una alternativa de suplementación de arginina. El metabolismo de citrulina libre se divide principalmente en su síntesis y degradación que ocurren en el intestino y en el riñón; respectivamente (Shigesada y Tatibana, 1971; Shigesada y Tatibana 1978). El efecto de la suplementación con citrulina ha sido demostrado principalmente en estudios de nutrición, se ha propuesto como un fármaco nutriente candidato para participar en el metabolismo de proteínas en enfermedades intestinales. Estos estudios han demostrado la eficacia de una dieta rica en citrulina en el síndrome del intestino corto y en malnutrición en ratas viejas (Hartman *et al.*, 1994). Una dieta enriquecida con una dosis de citrulina de (1g/kg/día) es capaz de generar altas concentraciones de arginina en varios tejidos y reestablecer el balance del nitrógeno; por lo tanto, se ha sugerido que a pesar de que citrulina no es un aminoácido componente de proteínas, puede influir en la síntesis de éstas (Osowska *et al.*, 2004).

Por su parte, se ha demostrado que arginina se vuelve un aminoácido esencial en condiciones de estrés; esto debido a que la degradación de arginina en urea por la enzima arginasa causa un decremento en el estado inmunológico. Arginina es necesaria para la correcta función de la respuesta inmune, por ejemplo, para la activación de los linfocitos T y para la expresión del receptor de células T, arginina es necesaria también para la expresión de receptores clave como son el CD3 y CD8, el desarrollo de la memoria y expresión de elementos clave de la vía de transducción de señales de las células T tales como la vía NF- κ B (Bansal *et al.*, 2004). El NO tiene un papel importante en la defensa del cuerpo contra organismos externos que quieren invadirlo. El decremento en los niveles de NO también puede inducir daño en la vasodilatación lo que resulta en un decremento en el flujo sanguíneo. Al menos dos trabajos han probado que citrulina es

un recurso eficiente para estimular la producción de NO en los macrófagos en situaciones de estrés como lo son las infecciones (Norris *et al.*, 1995; Zheng y Lin, 1998).

El aminoácido citrulina también participa en la biosíntesis del NO para control de la presión arterial. La vasodilatación y la vasoprotección son especialmente importantes, estos procesos pueden ser mejorados mediante la producción de NO, con base en lo anterior han sido realizados estudios en los que se emplea a citrulina como un precursor de NO mediante la vía de la arginina. Estos estudios demostraron una mejora en los pacientes y no reportaron efectos secundarios en pruebas clínicas en fase II (Waugh *et al.*, 2001).

Además, se ha probado que citrulina es un potente neutralizador de radicales hidroxilo, independientemente de la producción de NO, más bien mediante la interacción directa con el radical hidroxilo a través de la vía de alfa-aminoácidos en su estado NH₃ protonado, dejando como residuo la formación de agua (Nagy y Floyd, 1984; Coles, 2007) por lo que podría desempeñar un papel importante en la reducción de estrés oxidativo que se genera tanto en el envejecimiento normal como en la EA ya que se sabe que protege al DNA de daño por especies reactivas de oxígeno (Yokota *et al.*, 2002).

3.3 Citrulina en el envejecimiento

La suplementación con citrulina en el envejecimiento ha sido realizada en algunos estudios. En una investigación de Maquet-de Rougé y colaboradores, se estudió el efecto que la suplementación con citrulina podía tener sobre los patrones de las balsas lipídicas (microdominios de membrana involucrados en la señalización celular) en ratas y ratones envejecidos. Describieron subpoblaciones de balsas lipídicas, ligeras, medianas y pesadas en neuronas del hipocampo de ratones adultos jóvenes; sin embargo las subpoblaciones más abundantes en estos animales fueron las de balsas ligeras y medianas, se observó también en estos mismos animales baja cantidad de la proteína precursora amiloide y muy baja expresión de caveolina-1 (CAV-1); en contraste los ratones envejecidos mostraron subpoblaciones de balsas lipídicas en su mayoría pesadas, las cuáles contenían mayor cantidad de colesterol, CAV-1 y APP. La administración de citrulina en una dosis diaria de 1g/kg durante un período de 3 meses a ratas envejecidas fue asociada con la atenuación de estos patrones en balsas lipídicas relacionados con la edad, es decir las poblaciones de balsas lipídicas encontradas en los ratones envejecidos que recibieron el tratamiento de citrulina era muy semejante al patrón de balsas lipídicas observadas en los ratones jóvenes teniendo como efecto una

disminución en los niveles de colesterol, caveolin 1 y APP similares a las balsas lipídicas encontradas en los ratones jóvenes (Marquet-de Rougé *et al.*, 2013).

En otro estudio, encontraron que la suplementación con citrulina en ratas viejas desnutridas incrementa la proteína muscular mediante la estimulación de la síntesis de proteínas en animales viejos desnutridos (Duchemann *et al.*, 2004).

Tanto en pacientes con EA como en modelos animales de la enfermedad se ha reportado decremento de NO relacionado con un incremento en el déficit cognitivo (Dias *et al.*, 2016). El decremento en los niveles de NO endotelial también puede inducir daño en vasodilatación lo que resulta en un decremento en el flujo sanguíneo y reducción en la disponibilidad de glucosa y otros nutrientes que son necesarios para la actividad neuronal del cerebro, este decremento también ha sido relacionado con patologías cerebrovasculares y enfermedad neurológica; de hecho algunos polimorfismos en el gen de eNOS han sido asociados a aterosclerosis de la carotida, isquemia miocárdica y accidente cerebrovascular isquémico e incluso posiblemente también con EA, incluida la reducción en la expresión de la eNOS que ha sido reportada en cerebro de pacientes con EA (Jeynes y Provias, 2009).

Con base en estas observaciones de alteraciones asociadas a la producción de NO y la probable relación que esto puede tener con el desarrollo de la patológico de esta enfermedad, se han empleado modelos que no solo presenten una sobre expresión de las proteínas asociadas con la enfermedad si no también se ha optado por el uso de nuevos modelos murinos como los ratones heterocigotos eNOS^{+/-} (deficientes de eNOS) que serían un modelo espontáneo de hipoperfusión crónica para reproducir parte de lo que pasa durante la enfermedad de Alzheimer esporádica, estos animales durante el envejecimiento muestran lesiones principalmente en tres áreas cerebrales, cortezas temporoparietal, granular retrosplenial e hipocampo (Tan *et al.*, 2015); cada una de estas regiones concuerda con las áreas que presentan hipoperfusión en los pacientes pre-clínicos con EA (Luckhaus *et al.*, 2008; Schuff *et al.*, 2009; Hu *et al.*, 2010) En este trabajo con este modelo animal los autores encontraron una serie de eventos secuenciales, trombosis, angiopatía cerebral amiloide y déficit cognitivo, que los llevaron a proponer que la deficiencia parcial crónica de eNOS causa disfunción endotelial y de plaquetas lo que conduce a trombosis cerebral y

rompimiento de la barrera hematoencefálica lo que podría aumentar la producción de beta amiloide e impedir su limpieza. Todo lo anterior proponen que es debido a los niveles reducidos de NO que presenta este modelo por lo cual proponen un mecanismo similar en los pacientes con enfermedad de Alzheimer esporádica en los que no existe una sobre expresión de las proteínas implicadas en la enfermedad (Tan *et al.*, 2015).

Además, citrulina ha mostrado efectos benéficos en varias enfermedades neurológicas asociadas con estrés oxidativo. Ratones C57BL/6 con oclusión bilateral de las arterias carótidas que bloqueó la comunicación posterior induciendo isquemia cerebral global y posteriormente muerte neuronal en la región CA1 del hipocampo sin afectar las neuronas de las otras regiones, recibieron citrulina de manera oral en dosis diarias de 50, 75 ó 100 mg/kg durante diez días después de la cirugía. Citrulina demostró tener un efecto neuroprotector contra la muerte celular en la región hipocampal CA1 además de aumentar los niveles de expresión de eNOS y nNOS en esta estructura (Yabuki *et al.*, 2013). En otro estudio, utilizando un modelo murino transgénico para APP (APP^{SwDI}) y deficiente en mNOS2, que simula la progresión de la EA mediante la acumulación de placas de A β , de marañas neurofibrilares de Tau hiperfosforilada, incremento del déficit cognitivo y la pérdida neuronal de manera dependiente de la edad, Kan y colaboradores encontraron que la arginasa-1 (enzima encargada de degradar arginina) se encuentra altamente expresada en regiones en donde hay también acumulación de A β , sugiriendo que la disminución de arginina y la falta de nutrientes son responsables de la muerte neuronal. Además, los mismos autores encontraron que estos ratones tienen menor arginina total en el cerebro y que la inhibición farmacológica de las enzimas que utilizan arginina revierte la acumulación de A β , la inmunosupresión y el déficit de memoria (Kan *et al.*, 2015). Al respecto, se sabe que en el sistema nervioso central sólo hay dos fuentes de arginina: la obtenida a partir del ciclo de L-citrulina y la que entra a través de la barrera hematoencefálica transportada por proteínas específicas.

Por último, en otro estudio encontraron que los niveles de citrulina en el líquido cefalorraquídeo son significativamente mayores en la demencia vascular en comparación con un grupo control, además reportaron que no se eleva la actividad de NOS en los microvasos del cerebro de pacientes con Alzheimer, pero aumenta la producción de NO vascular, esto fue probado tanto en pacientes como en modelos murinos

transgénicos para la EA, la expresión de eNOS en astrocitos es mayor que la expresión de iNOS (Luth *et al.*, 2001), el aumento de NO vascular podría provocar neurotoxicidad, lo cual podría ocasionar susceptibilidad a la lesión neuronal y muerte celular en esta enfermedad; aunque hasta ahora se ha reportado que es el aumento en la actividad de iNOS el que genera concentraciones de NO suficientes para causar neurotoxicidad. Se ha sugerido que, a través de una intervención farmacológica, utilizando donadores y/o supresores de NO, se podría retrasar o al menos minimizar el desarrollo de la lesión cerebral y la progresión de la patología cerebral y la demencia.

Además de estos trabajos también se ha probado el efecto anti-inflamatorio de la administración oral de citrulina en personas envejecidas, se reportó disminución en las concentraciones de citocinas inflamatorias (IL-6, factor de necrosis tumoral (TNF)-alfa, y proteína reactiva C) en suero de estos pacientes (Barkhidarian *et al.*, 2016).

Varios estudios sugieren que la suplementación con L-citrulina tiene efectos benéficos en el contexto de procesos de inflamación crónica de bajo grado asociados al envejecimiento (Franceschi *et al.*, 2000).

Hasta ahora el uso de citrulina se ha realizado de manera segura en distintos padecimientos y durante el envejecimiento en algunos modelos animales; sin embargo en el campo de investigación de las enfermedades neurodegenerativas el empleo de citrulina no ha sido informado ampliamente.

4. *Modelos murinos*

El estudio de enfermedades humanas en modelos animales ha permitido el avance en muchas disciplinas; facilita el estudio de los procesos moleculares del padecimiento. Los modelos murinos permiten evaluar, caracterizar y experimentar a diferentes niveles y en diferentes etapas de la enfermedad. Basados en las mutaciones hasta ahora descritas y relacionadas con la EA se han creado modelos animales que emulan las características de la enfermedad tal cual ocurre en humanos, facilitando así el estudio de procesos moleculares y estudios farmacológicos. Uno de los modelos animales más empleados en el estudio de ésta enfermedad es el modelo murino; estos animales resultan ser la alternativa más viable debido a que tienen un período de gestación muy corto (20 días), son pequeños y generalmente poco agresivos, lo que facilita su manejo, además de estas razones que tienen que ver más con el mantenimiento y el manejo de los animales, también hay que tomar en cuenta las similitudes a nivel genético, como la organización de su DNA y la forma en la que se expresan sus genes, que es muy similar a la de los seres humanos y la característica de mayor interés para los modelos de la EA es que su sistema nervioso es muy parecido al humano.

Los animales transgénicos que tienen mutaciones relacionadas con la sobreproducción de APP desarrollan una patología similar a la reportada en humanos; la acumulación de A β en placas intra y extracelulares es dependiente de la edad, y ocurre principalmente en la adultez tardía de los animales. Las placas de A β encontradas en estos animales son similares estructuralmente a las que se presentan en la EA humana; éstas inician como placas difusas que contienen principalmente A β_{42} , desarrollan un núcleo denso de compuesto de A β_{42} y después incorporan A β_{40} y otros compuestos que no son A β como la ubiquitina y la α -sinucleína (LaFerla y Green, 2012).

Sin embargo, en los modelos murinos, la formación de placas en cerebro ocurre muy rápido, estos modelos exhiben déficit cognitivo antes de la aparición de placas extracelulares. En cambio, en humanos el declive cognitivo inicia hasta que se tiene una gran cantidad de acumulación de A β en el cerebro incluyendo grandes cantidades de placas y probablemente oligómeros. Dado que esto ha sido observado en tejido humano post-mortem, la evidencia que se tiene acerca de la toxicidad de los oligómeros de A β proviene del uso de animales transgénicos (Hass y Selkoe, 2007; Wang *et al.*, 1999).

Por su parte, los modelos que presentan sobreexpresión de APP no desarrollan marañas neurofibrilares (NFT's) de proteína TAU lo cual puede deberse a diversas razones: que la acumulación de A β podría no ser suficiente para generar estas NFT's, que la proteína Tau de los ratones tiene diferente estructura y secuencia la cual no es propensa a agregación y/o que el tiempo de vida de los ratones no es suficiente para observar la hiperfosforilación y posteriormente la agregación de Tau tomando en cuenta que en humanos esto se desarrolla durante décadas. Por esta razón, fueron creados los modelos que además de poseer las mutaciones en APP tienen mutaciones humanas de Tau que permiten estudiar la relación entre A β y Tau, en algunos de estos trabajos se sostiene la teoría de que la patología de A β precede a la aparición de Tau, lo cual es consistente con la hipótesis de la cascada amiloide que propone además de otros mecanismos en los que A β podría estar favoreciendo la acumulación de Tau, que la función del proteosoma se ve comprometida por la presencia y acumulación de oligómeros de A β que impiden su función dentro de las cuales está la degradación de Tau, por lo anterior se genera acumulación de esta proteína (LaFerla y Green, 2012).

Basados en estas evidencias se han creado distintos modelos que hasta ahora han ayudado a esclarecer algunos de los mecanismos moleculares de esta enfermedad *in vivo* como son las interacciones proteína-proteína y las respuestas celulares implicadas en la EA. A lo largo de los años desde hace casi 20 años, se han ido perfeccionando cada vez más los modelos murinos con el objetivo de acercarlos más a lo que pasa en EA en humanos.

Para lograr los objetivos establecidos en la presente tesis, se utilizó el modelo Murino Triple Transgénico para la EA (3xTgAD), la elección de este modelo se realizó con base en las características patológicas que presenta, ya que son muy similares a lo que ocurre en la enfermedad en humanos.

4.1 Modelo Murino Triple Transgénico De Alzheimer

El modelo murino triple transgénico fue elaborado en la *University of California, Irvine*. Oddo y su equipo describen en el 2003 (Oddo *et al.*, 2003) un ratón en el que se puede estudiar la relación entre la acumulación de la proteína tau hiperfosforilada y la agregación del péptido β -amiloide₁₋₄₂ (A β). Este modelo transgénico desarrolla los depósitos de A β antes de la formación de ovillos neurofibrilares y exhibe déficits

en plasticidad sináptica, para obtenerlo se inyectan genes con las mutaciones APP_{Swe} y tau P_{301L} a embriones de ratón knock-in para la mutación PS1_{M146V} del gen presenilina 1. Ambos genes se introducen en un cassette bajo el control del elemento regulador Thy 1.2, que se ha visto regula la expresión de transgenes específicamente en el sistema nervioso central (Figura 1) (Oddo *et al.*, 2003).

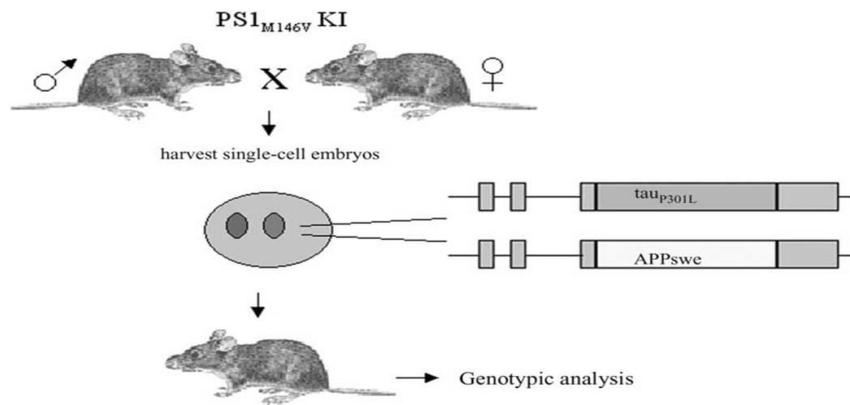


Figura 3. Tomada de Oddo *et al.*, 2003. Generación del modelo murino 3xTg-AD. Se utilizó la técnica de microinyección pronuclear coinyectados con dos constructos de transgenes independientes codificantes de APP_{Swe} y tauP_{301L} humanos, ambos bajo el control del elemento regulador del ratón Thy1.2, en células de embriones cosechadas de ratones knock-in homocigotos mutantes PS1M146V. Los embriones inyectados se reimplantaron en madres sustitutas y las crías resultantes se genotipificaron para identificar a los ratones 3xTg-AD.

En los ratones 3xTg-AD, la acumulación de β A intraneuronal se observa en la neocorteza entre los 3 y 4 meses de edad, mientras que a los 6 meses estos depósitos se pueden observar en el hipocampo. Los depósitos extracelulares se presentan desde los 6 meses y se vuelven más evidentes a los 12 meses de edad. A esta edad, los ratones comienzan a presentar la patología de Tau, primero en el hipocampo y posteriormente en áreas corticales (Oddo *et al.*, 2003).

A nivel conductual, en el modelo 3xTg-AD, los ratones presenta déficit cognitivo a partir de los 4 meses de edad en el laberinto acuático de Morris (una tarea para medir la memoria espacial) con una memoria de corto plazo intacta, pero de largo plazo afectada; a los 6 meses ya presentan también un deterioro de la memoria de corto plazo.

Con el propósito de valorar el deterioro cognitivo, en el presente trabajo se diseñaron los experimentos en el laberinto acuático de Morris ya que se sabe que esta tarea conductual es dependiente de hipocampo, por

lo tanto permite evaluar el daño en esta estructura; con base en esto y en la evidencia reportada de que la tarea conductual de condicionamiento contextual al miedo (dependiente de hipocampo pero también de amígdala), los animales 3xTgAD presentan déficit en memoria a largo plazo a esa edad (Billings *et al.*, 2005), se eligió esta tarea conductual para valorar el deterioro cognitivo y el efecto de la administración de citrulina sobre el mismo.

5. JUSTIFICACIÓN

Además de las lesiones clásicas ocasionadas por la acumulación de β amiloide y tau hiperfosforilada, se han reportado otras características de los pacientes con EA tales como la desregulación del metabolismo de aminoácidos, flujo cerebral alterado, cambios en la integridad de la vasculatura, el incremento de estrés oxidativo y daño al DNA. Todos estos factores juegan un papel en los mecanismos que conducen al deterioro cognitivo y pérdida celular reportado en la enfermedad. Hasta ahora, no se sabe con certeza si estos cambios son causa o efecto de la EA pero siempre se encuentran presentes.

La administración de citrulina podría tener efectos sobre algunos de estos factores tales como la reducción de estrés oxidativo, la regulación del metabolismo de lípidos o incrementando la producción de NO. Este aminoácido ha sido probado en pacientes con otras enfermedades, por ejemplo en adultos mayores con insuficiencia cardíaca, la administración aguda de (10g) incrementó la síntesis de novo de L-arginina y NO (Kim *et al.*, 2015); en pacientes con angina vasoespástica, la administración de citrulina durante 8 semanas en una dosis de 800mg/día mejoró los niveles de L-arginina/ADMA y la función endotelial medida por la dilatación mediada por el flujo de la arteria braquial (Morita *et al.*, 2013), citrulina grado farmacéutico y nutracéutico y el extracto de sandía en una dosis de 6g al día durante seis semanas demostraron eficacia reduciendo la presión arterial en pacientes del sexo masculino obesos pre-hipertensos e hipertensos (Figueroa *et al.*, 2012).

El uso del modelo de ratón triple transgénico (3xTg-AD) para la enfermedad de Alzheimer, nos permitirá evaluar los efectos de citrulina sobre el déficit cognitivo asociado a la progresión de esta enfermedad, esto

mediante el desempeño conductual de los animales, así como en la producción de arginina en el SNC, producción de óxido nítrico y cambios en el estrés oxidativo.

La prueba de medicamentos, complementos alimenticios o adyuvantes para la disminución de los síntomas de la EA es de principal interés, ya que a la fecha no hay tratamiento para los pacientes con esta enfermedad. De comprobarse un efecto positivo con la administración de citrulina, podríamos ayudar a una mejora en la calidad de vida de los pacientes con demencia ocasionados por la EA.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A la fecha no existe una cura para la Enfermedad de Alzheimer; por ello, existe investigación mundial dedicada a la búsqueda de algún tipo de ayuda a los pacientes que sufren esta enfermedad tratando de incrementar la calidad de vida. La experimentación en modelos animales que desarrollan la EA, en este caso ratones transgénicos, es un área de gran importancia para los avances en el estudio de patologías neurodegenerativas debido a que estas patologías, por su etiología neurobiológica y limitaciones éticas, no pueden ser investigadas desde la clínica con la profundidad que se necesita.

Citrulina es considerada un complemento alimenticio sin efectos secundarios adversos cuyos efectos benéficos incluyen el incremento plasmático de L-arginina, incremento del flujo sanguíneo y disminución de la presión arterial, así como un incremento de la oxigenación muscular. Se ha visto que mejora la perfusión microvascular, que incrementa los niveles de óxido nítrico, reduce niveles de radical hidroxilo y disminuye el daño al DNA por especies reactivas de oxígeno.

La administración de citrulina en un modelo murino para la EA, permitirá evaluar si provoca cambios en el deterioro cognitivo ocasionado por esta enfermedad y relacionarlos con procesos tales como cambios en la concentración de arginina, la producción de ON y la concentración del radical hidroxilo en el SNC.

6. HIPÓTESIS

La administración de citrulina en el modelo murino reducirá el deterioro cognitivo asociado a la enfermedad de Alzheimer.

7. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la administración de citrulina sobre el déficit cognitivo y sobre procesos moleculares (niveles de arginina, producción de óxido nítrico y estrés oxidativo) asociados a la enfermedad de Alzheimer en el modelo murino triple transgénico.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar el desempeño conductual mediante la tarea de memoria espacial Laberinto acuático de Morris en animales transgénicos y controles con y sin tratamiento oral de citrulina.
- Evaluar el efecto de la administración de citrulina sobre la cantidad de arginina en líquido cefalorraquídeo e hipocampo de animales transgénicos y controles con y sin tratamiento oral de citrulina.
- Evaluar el efecto de la administración de citrulina sobre la cantidad de óxido nítrico en hipocampo de animales transgénicos y controles con y sin tratamiento oral de citrulina.
- Evaluar el efecto de la administración de citrulina sobre la cantidad de radical hidroxilo en hipocampo de animales transgénicos y controles con y sin tratamiento oral de citrulina.

8. METODOLOGÍA

Animales

Todos los procedimientos realizados en este proyecto contaron con la aprobación del comité de ciencia y ética (R-2012-785-049) del Instituto Mexicano del Seguro Social y se realizaron de acuerdo a la Ley (NOM-062-ZOO-1999).

Se utilizaron ratones macho y hembras de 5 y 9 meses de edad adquiridos en *Jackson Laboratories* y reproducidos en el bioterio de la Coordinación de Investigación en Salud en el Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social. El estudio constó de 16 grupos: 3xTg-Cit (animales triple transgénico con administración de citrulina), 3xTg-Con (con administración de agua), WT-Cit (animales silvestres con administración de citrulina), WT-Con (animales silvestres con administración de agua) de dos edades distintas 5 y 9 meses machos y hembras (Tabla 1).

CEPA	3XTGAD		WT	
	♀	♂	♀	♂
5 MESES				
AGUA	8	8	8	8
CITRULINA	8	8	8	8
9 MESES				
AGUA	4	4	4	4
CITRULINA	4	4	4	4

Tabla 1. Modelo murino 3xTgAD y WT machos y hembras de cinco y nueve meses de edad con tratamiento de agua o citrulina, ocho animales por grupo experimental para la edad de cinco meses y cuatro animales por grupo experimental para la edad de nueve meses.

Los animales estuvieron en un ambiente controlado luz/oscuridad 12h/12h a una temperatura de $18 \pm 3^\circ\text{C}$. A lo largo del proyecto, los animales se mantuvieron en grupos de 1 a 4 animales en cajas de acrílico con tapa con filtro y cambio de la cama de aserrín cada tercer día. El acceso a comida y agua fue *ad libitum* hasta el día de su eutanasia. Se monitoreó su salud por personal del bioterio capacitado para tal fin.

Cálculo de la muestra

En total por los 16 grupos (machos/hembras) se emplearon 96 animales (tabla 2), quedando de la siguiente manera:

GRUPO	CEPA	NO DE ANIMALES (MASCULINO/FEMENINO)
3XTGAD-CIT	B6;129PSEN1tm1MpmTg	8/8
3XTGAD-AGUA	B6;129PSEN1tm1MpmTg	8/8
3XTGAD-CIT	B6;129PSEN1tm1MpmTg	4/4
3XTGAD-AGUA	B6;129PSEN1tm1MpmTg	4/4
WT-CIT	B6129SF21J	8/8
WT-AGUA	B6129SF21J	8/8
WT-CIT	B6129SF21J	4/4
WT-AGUA	B6129SF21J	4/4

Tabla 2. Número de animales por cepa y por grupo experimental. 3xTgAD-CIT 5M: triple transgénico administrados con citrulina grupo 5 meses, WT-CIT 5M: wild type administrados con citrulina grupo 5 meses, 3xTgAD-CIT 9M: triple transgénico administrados con citrulina grupo 9 meses, WT-CIT 9M: wild type administrados con citrulina grupo 9 meses.

Las variables dependientes, así como las independientes son mostradas en la Tabla 3. Se puede observar que la variable envejecimiento contempla el tiempo transcurrido desde el nacimiento del animal hasta el momento que alcanza la edad de interés para el estudio; tanto esta variable como la cepa de animales y la citrulina son consideradas variables independientes ya que contribuyen potencialmente a la variación observada en los resultados; por otro lado el desempeño conductual, los marcadores moleculares de arginina, óxido nítrico y radical OH se consideran variables dependientes debido a que representan el resultado del cual se está analizando la variación.

VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	TIPO DE VARIABLE	ESCALA DE MEDICIÓN	UNIDAD DE MEDICIÓN
CITRULINA	Aminoácido no esencial intermediario del ciclo de la urea	Independiente o predictora	Cualitativa nominal, dicotómica	Si/No
TRANSGÉNICO PARA LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	Demencia caracterizada por la presencia de placas de beta amiloide y marañas de Tau hiperfosforilada	Independiente	Cualitativa nominal, dicotómica	Si/No
ENVEJECIMIENTO	Proceso biológico que incluye una serie de cambios estructurales y funcionales que aparecen con el paso del tiempo	Independiente	Cuantitativa, discreta	Meses
DESEMPEÑO COGNITIVO	Evaluación de la memoria mediante la tarea de Laberinto acuático de Morris	Dependiente	Cualitativa nominal	Latencia
ARGININA	Aminoácido	Dependiente	Cuantitativa discreta	Micromoles
ÓXIDO NÍTRICO		Dependiente	Cuantitativa discreta	Nanomoles
RADICAL HIDROXILO		Dependiente	Cuantitativa discreta	Micromoles

Tabla 3. Descripción de las variables de estudio.

Administración citrulina/ agua

La administración de citrulina o agua se realizó vía esofágica. Se administró una dosis de citrulina previamente reportada en la literatura de 1g/kg/día disuelta en 200µL de agua, diariamente durante 12 semanas (3xTg-Cit y WT-Cit) por la mañana en un horario entre 10 y 12 horas (Marquet-deRouge *et al.*, 2013), mientras que a los animales control se les administró 150 ul de agua (3xTg-Agua y WT-Agua). Para la administración de citrulina o agua se utilizó una sonda reusable de acero inoxidable para alimentación de animales pequeños (Kent Scientific) de 20G con una longitud de 1.5" y diámetro de 2.25mm. Se pre-cargó una jeringa con el volumen a administrar (200µL) la cual fue acoplada a la sonda; se presionó el émbolo lentamente asegurando que no entrara aire al estómago del animal, esto mediante la expulsión de la burbuja de aire que se formó en la jeringa, se midieron los microlitros que se quedaban en la sonda esofágica después de la administración y se llenó las jeringas para administración tomando en cuenta este volumen.

Laberinto acuático de Morris

Los animales fueron manipulados siempre por el mismo investigador (la alumna Katia Martínez) para evitar estrés. El investigador siempre usó guantes para cualquier manipulación de los animales. Las tareas conductuales se realizaron dentro del bioterio, con el fin de evitar estrés al animal y tener un resultado más confiable de la prueba de conducta.

El laberinto de agua fue diseñado por R.G. Morris para evaluar la memoria espacial en ratas (Morris, 1984).

Consiste en una tina circular llena de agua en la que se sitúa una plataforma que debe ser localizada por el animal y cuya temperatura oscila entre 18 y 25 °C para los ratones. En nuestro trabajo la tina tenía un diámetro de 150 cm y la altura de las paredes fue de 57 cm, se llenó de agua que se opacó con pintura blanca no tóxica para que la plataforma de escape (15 x 20 cm) quedara oculta. El laberinto es una tarea espacial en la que los animales nadan desde diferentes puntos de salida situados en el perímetro de la tina hasta encontrar la plataforma sumergida (1.5cm) en el agua. Con esta prueba es posible valorar la memoria de referencia, si la plataforma permanece en el mismo lugar durante los ensayos. Así, la memoria de referencia es independiente de los ensayos y permite aprender el procedimiento general para la ejecución de la tarea. Para esta tarea, la plataforma se ubicó en el mismo lugar durante los cuatro ensayos y los 4 días que duró el entrenamiento, el quinto día (día de prueba), la plataforma se retiró de la tina y se midió el tiempo (en segundos) que los animales tardaban en llegar al lugar en el cual estaba la plataforma durante los días de entrenamiento.

El análisis de los datos obtenidos de la conducta el día de la prueba se realizó mediante el software de libre acceso KINOVEA, con éste se determinó la velocidad promedio de los animales de ambas cepas y de los diferentes grupos, el tiempo que tardaron los animales en llegar al lugar donde se encontraba la plataforma durante los días de entrenamiento y la distancia en metros que recorrieron hasta ahí, además se calculó el tiempo que permanecieron los animales en el cuadrante y el número de cruces que realizaron sobre el lugar donde los días previos se encontraba la plataforma.

Extracción de líquido cefalorraquídeo (LCR) mediante punción de foramen mágnum

Se extrajo líquido cefalorraquídeo de 4 animales por grupo posterior a la prueba de memoria, para el análisis mediante HPLC.

Se durmió al ratón mediante anestesia inhalada (sevofluorano), en una cámara de inducción anestésica 3 al 4%, mantenimiento al 2%. Una vez que el animal se encontró anestesiado, se colocó en posición fetal dejando expuesta la columna vertebral y se realizó la punción en el foramen magnum localizado debajo del hueso occipital; se extrajeron aproximadamente 4 μ L de líquido cefalorraquídeo con una aguja para jeringa de insulina de 50 unidades (27 G x 13 mm; 0.40 mm x 1/2").



Se colocó al animal de regreso en su caja monitoreando su respiración y ritmo cardíaco hasta que pasó el efecto de la anestesia, para corroborar que se recuperó correctamente.

Eutanasia y extracción de estructuras

Realizamos eutanasia de los animales mediante una inyección de pentobarbital con NaCl 0.9% en una dosis de 50mg/kg, y posteriormente se les decapitó, en un período no mayor a tres días después de la prueba de la tarea conductual. La cabeza del animal se puso sobre papel filtro dentro de una caja Petri sobre hielo mientras se realizó el proceso de abrir el cráneo para la extracción de las estructuras. Se extrajeron el hipocampo y cerebelo de cada animal mediante el uso de material quirúrgico estéril con el uso del atlas de ratón (45) como referencia. Las estructuras se colocaron en un tubo de 1.5 mL se procedió inmediatamente

a pesar las estructuras y posteriormente se colocó buffer de lisis a cada tubo. El homogenado se almacenó a -20 °C hasta su uso.

Los animales iniciaron los procedimientos a los 5 (3xTg-Cit, 3xTg-Agua, WT-Cit y WT-Agua) y 9 meses de edad (3xTg-Cit, 3xTg-Agua, WT-Cit y WT-Agua) a partir de los cuales pasaron 3 meses y medio más antes de ser sacrificados, esto, con el fin de cumplir con el esquema de trabajo (administración de citrulina o agua y pruebas de conducta). Por lo tanto, el tiempo de sobrevida de los animales fue de 8 y 12 meses respectivamente.

Detección de Arginina por UPLC

Se empleó Ortho-ftaldialdehído (OPA) y ácido 3-mercaptopropiónico para la derivatización pre-columna y detección de fluorescencia. Las columnas fueron SPE de intercambio catiónico Strata - X - C (30 mg, 1 mL). Se emplearon acetonitrilo (CH₃CN) y metanol de grado HPLC (CH₃OH). La solución madre de MMA (1mmol/L) se preparó gravimétricamente en PBS. La solución de trabajo contenía 10µmol/L de MMA y se almacenó a menos 20°C. Antes del análisis, la solución se diluyó en HCl 10mM. Se obtuvieron cuatro puntos de calibración (patrón de dilución 1: 2: 2: 2) diluyendo en HCl 10mM. Se preparó una solución madre de reactivo de derivatización disolviendo 10mg de OPA en 0.2 ml de CH₃OH, seguido de la adición de 1.8 mL de un tampón de borato de potasio 0.2 M (pH 9.5) y 10 de ácido 3-mercaptopropiónico, la solución de trabajo se hizo por dilución doble con tampón de borato.

Las muestras se purificaron mediante columnas SPE y una derivatización pre-columna. Antes del análisis, se diluyeron 200 µL de muestra, 600 µL de PBS y 200 µL del control interno (monometilarginina 10µmol/L). Las columnas se acondicionaron primero con 1 mL solución tampón (10/0.5/40/50; NH₃ concentrado/1M NaOH/H₂O bidistilada/CH₃OH; v/v/v/v) seguido de 1 mL de H₂O bidestilada antes de cargar la muestra diluida. Se hizo un lavado con 1 mL de HCl 0.1M, posteriormente se hizo otro lavado con 1 mL de CH₃OH. La velocidad de recogida fue de 2 ml/min. El eluido se secó por soplado con gas nitrógeno (60° C); el residuo se disolvió en 100 µL de solución de trabajo del reactivo de derivatización. Tras completar la reacción de derivatización, se añadieron 100 µL de KH₂PO₄ 0.2M. en viales de muestreo automático, que se colocaron en

el compartimento de muestra refrigerado del módulo de separación en un equipo de UHPLC fue un Agilent 1100 (Agilent Technologies, California, EE.UU.) y un detector de fluorescencia modelo RF-10AXL.

La separación cromatográfica (30 μ L de volumen de inyección) se hizo a 35°C en un Chromolith Performance RP-18 (100 \times 4,6mm) con un cartucho protector (10 \times 4.6mm). La fase móvil A se realizó con tampón fosfato 25mM (CH_3CN al 7%) pH 6.5 y la fase móvil B, $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ bidestilada (50:50). La separación se realizó isocráticamente a 100% de fase móvil A, a un caudal de 1.5 mL/min. Después de la elución de Arginina, la fase móvil se conmutó al 100 % de la fase móvil B, y el caudal se incrementó a 2.0 mL/min para lograr la elución de compuestos fuertemente retenidos. La fluorescencia de excitación fue de 340 nm a una emisión de 455 nm.

Determinación de nitritos mediante la técnica de Griess

La técnica de Griess fue desarrollada por Miranda y colaboradores y consiste en la reducción de nitratos a nitritos por medio del cloruro de vanadio (III) (VCl_3); con la posterior detección de los nitritos mediante un espectrofotómetro.

Los homogenados de tejido (100 μ L) se desproteinizaron por filtración en tubos Microcon YM-50 y fueron centrifugados a 2000 rpm durante 40 minutos a 20° centígrados; después de la centrifugación se obtuvo 50 μ L de homogenado desproteinado, a los que se le adicionaron 100 μ L de agua desionizada y 150 μ L de cloruro de vanadio 0.8% en ácido clorhídrico (HCl) 1N y 150 μ L de ácido sulfanílico al 2% y naftiletildiamina (NED) al 0.1%. Las muestras se incubaron a 37 grados centígrados durante una hora y centrifugados a 9000 rpm durante 10 minutos. Los supernadantes se midieron a una longitud de onda de 545 nm en un espectrofotómetro (EPOCH). Se realizó curva estándar mediante diluciones seriales de NaNO_3 100 μ M (Miranda *et al.*, 2001).

Determinación de radical OH

La determinación de radical hidroxilo se realizó mediante el método 2-deoxi-ribosa, el cual se basa en la degradación de la deoxyribosa catalizada por el Fe^{III} -EDTA.

Procedimiento

Los reactivos se agregaron en el orden de la lista en tubos eppendorf de 1.5 mL. Los tubos se incubaron a 37°C durante una hora en baño maría con agitación, posteriormente se centrifugaron a 9000 rpm durante 3 minutos en una microcentrífuga. Se tomaron 600 µL, se adicionaron 500 µl de TBA en tubos de vidrio, se agitaron y se adicionaron 500 µl de ácido tricloroacético y se agitaron nuevamente. Se incubaron las muestras a 100 °C durante 20 minutos. 200 µl de cada muestra se leyeron a una longitud de onda de 532 nm en un espectrofotómetro (EPOCH).

REACTIVOS/MUESTRA

ML

0.5ML DE DESOXIRIBOSA	500 µL
0.01ML EDTA/FE ³⁺ PH 7.4	10 µL
0.28ML DBS DUBELCOS PH 7.4	280 µL
12.5 ML MUESTRA	12.5 µL

Esquema de trabajo

A continuación, se presenta un esquema de los procedimientos que se siguieron en este protocolo:



Análisis estadístico

Se utilizó el paquete estadístico Graph Pad Prism 8, con el cual determinamos primero si los datos tenían o no una distribución normal mediante las pruebas de normalidad D'Agostino-Pearson omnibus normality test ó Shapiro-Wilk normality test, tras lo cual decidimos que para el análisis de resultados obtenidos se emplearían pruebas estadísticas no paramétricas ya que los datos obtenidos no mostraron una distribución Gaussiana.

Para corroborar que los animales aprendieron la tarea conductual (los cuatro ensayos diarios durante cuatro días) realizamos una ANOVA de repetidas medidas (la única prueba de estadística paramétrica que se realizó con los datos obtenidos) se eligió esta prueba debido a que los datos obtenidos de los ensayos mostraron una distribución normal (Gaussiana). Para los datos relacionados con la prueba conducta (el quinto día), realizamos la prueba estadística no paramétrica de Kruskal-Wallis para comparar entre grupos; el test Original de Tasa de Falso Descubrimiento (False Discovery Rate) de Benjamini y Hochberg para determinar diferencias específicas entre grupos.

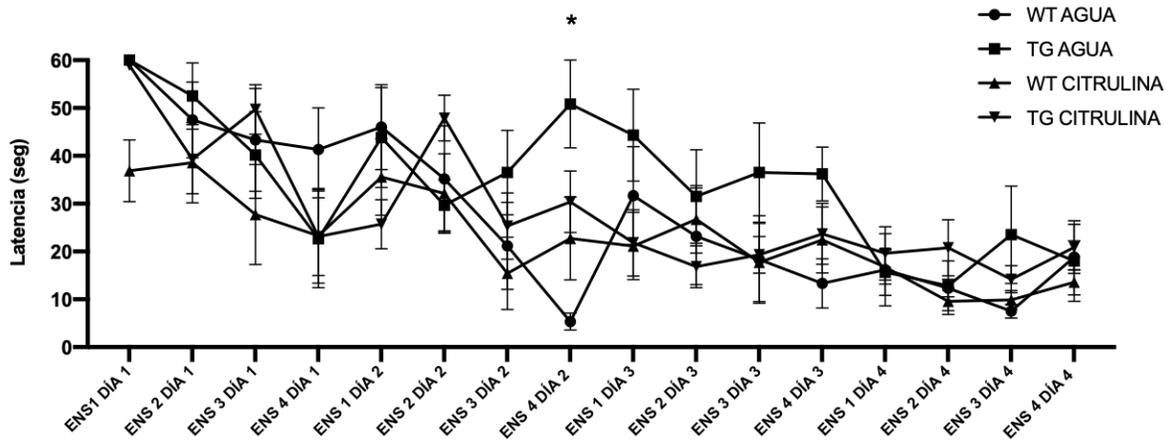
Para los resultados obtenidos mediante el análisis de niveles de arginina por UHPLC se realizó una prueba estadística no paramétrica Kruskal-Wallis para comparar entre grupos 3xTg-AD y WT y tratamientos (citrulina y agua), con el test Original de Tasa de Falso Descubrimiento (False Discovery Rate) de Benjamini y Hochberg para saber entre qué grupos específicos se encontraban éstas diferencias; realizamos las mismas pruebas estadísticas para las demás mediciones moleculares tales como concentración de NO y niveles de radical hidroxilo, la elección de la prueba estadística se basó en los test de normalidad y el número de animales con los que se contó por grupo.

9. RESULTADOS

Memoria

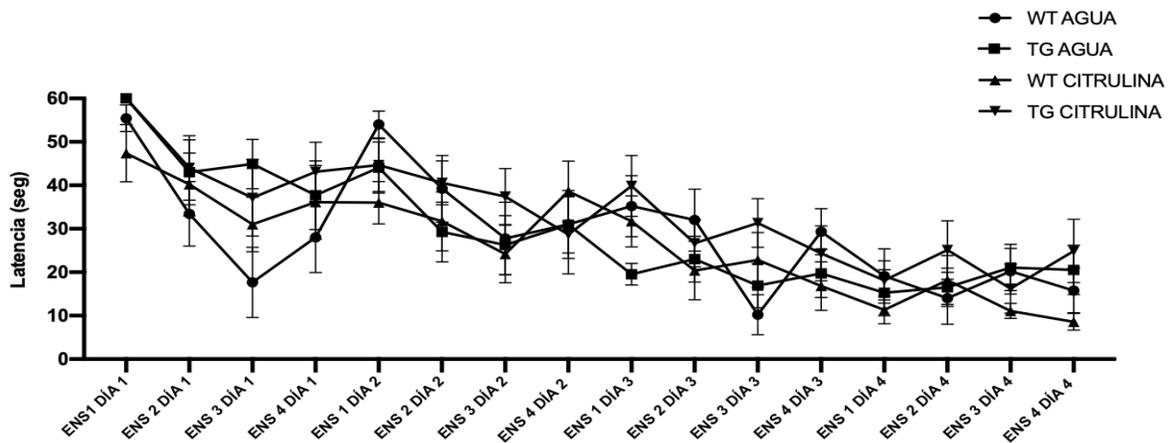
Con el fin de evaluar el desempeño conductual de los animales después de la administración de citrulina o agua, los animales fueron entrenados y probados en el laberinto acuático de Morris. El número de animales para todas las pruebas conductuales fue de 16 ratones por cepa (3xTgAD o WT), 8 por tratamiento (citrulina o agua) en el caso de los animales que iniciaron el tratamiento a los 5 meses de edad y fueron probados conductualmente tres meses después a los 8 meses de edad; en el caso de los animales que iniciaron el tratamiento a los 9 meses de edad y fueron probados conductualmente tres meses después a los 12 meses de edad, el número de animales por tratamiento fue de 8 por cepa (3xTgAD o WT).

Durante el entrenamiento, todos los grupos de 8 meses de edad (3xTgAD y WT, de ambos tratamientos, ambos sexos) redujeron su latencia de escape. En la gráfica 1 se muestra desempeño conductual en latencia, por ensayo (4 ensayos) por día (4 días) de los machos de ambas cepas (3xTgAD o WT) con los dos tratamientos (citrulina o agua), se observó una disminución de la latencia (en segundos) a través de los ensayos y los días. Éste decremento en la latencia se corroboró mediante el análisis estadístico de ANOVA de repetidas medidas; se comprobó una disminución en la latencia durante los ensayos ($F(15.45) = 7.75, p < 0.001$) sin embargo no se observó ninguna diferencia en la latencia entre las cepas durante los ensayos ($F(1.525) = 1.60, p > 0.05$) ni tampoco algún efecto en la latencia debido al tratamiento (citrulina o agua) durante los ensayos ($F(1.525) = 0.92, p > 0.05$) la única diferencia que pudimos observar durante el entrenamiento, mediante la prueba post hoc de Tukey, fue entre los machos 3xTgAD con tratamiento de agua y los WT con el mismo tratamiento, en el último ensayo del segundo día de entrenamiento ($p = 0.001$); al día siguiente no se observaron diferencias significativas por lo cual consideramos que no existen diferencias significativas en el aprendizaje entre cepas ni tratamientos en machos de 8 meses de edad.



Gráfica 1. Aprendizaje en el Laberinto acuático de Morris. Machos 8 meses de edad. TG: 3xTgAD, WT: Wild type, ■ TG agua, ▲ WT citrulina, ▼ TG citrulina, ● WT agua, ENS: Ensayos. $p < 0.001$, * $p = 0.001$. Los símbolos representan las medias y las barras el error estándar.

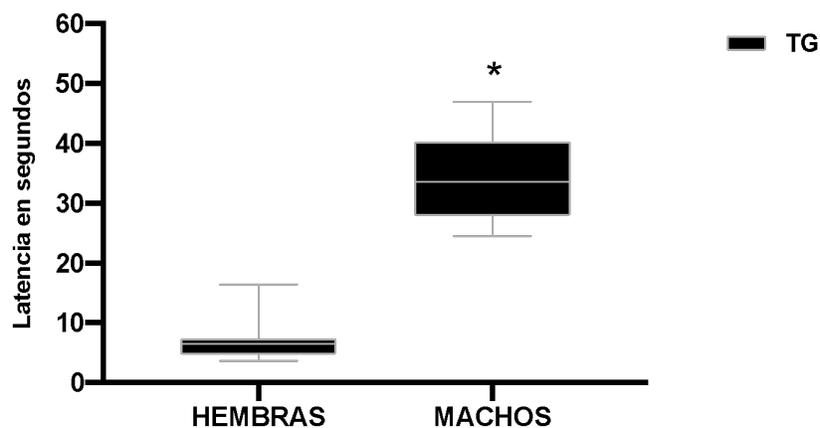
El mismo análisis se realizó a los tiempos de entrenamiento de las hembras, en la gráfica 2 se observa un decremento en la latencia a través de los ensayos y los días de entrenamiento. Hay una disminución significativa de la latencia durante los ensayos ($F(15,27) = 14.30$, $p = 0.02$), no se observó ninguna diferencia en la latencia entre las cepas durante los ensayos ($F(1,405) = 0.85$, $p > 0.05$), o algún efecto en la latencia debido al tratamiento (citrulina o agua) durante los ensayos $F(1,405) = 0.80$, $p > 0.05$).



Gráfica 2. Aprendizaje de Laberinto acuático de Morris. Hembras 8 meses de edad. TG: 3xTgAD, WT: Wild type, ■ TG agua, ▲ WT citrulina, ▼ TG citrulina, ● WT agua, ENS: Ensayos. $p = 0.02$. Los símbolos representan las medias y las barras el error estándar.

Esto indica que los animales con ambos tratamientos aprendieron la tarea conductual de manera similar, el tratamiento con citrulina no tiene un efecto sobre el aprendizaje de esta tarea espacial. El efecto que la administración de citrulina podría tener en esta tarea conductual no había sido definido debido a las diversas rutas metabólicas que citrulina administrada de manera esofágica podía seguir.

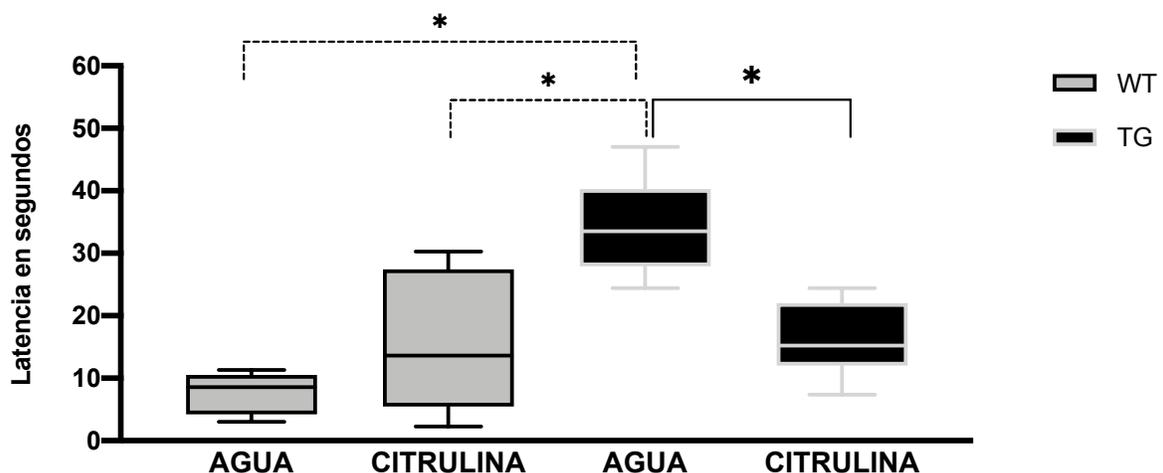
Después del entrenamiento (24 horas después) se realizó la prueba de memoria a largo plazo, la cual consistió en retirar la plataforma de la tina y colocar al animal en uno de los cuatro cuadrantes de la misma para permitirle nadar libremente durante un minuto. Obtuvimos el tiempo de latencia, el tiempo (en porcentaje) en el cuadrante de la plataforma, el número de cruces sobre el lugar donde se encontraba la plataforma, la distancia recorrida antes de llegar al lugar en donde se encontraba la plataforma durante los entrenamientos y la velocidad promedio de cada animal. El día de la prueba observamos diferencias estadísticamente significativas dependientes del sexo en el desempeño de los animales, lo cual se puede observar en la gráfica 3. Es evidente que las hembras 3xTgAD a las que se les administró agua tienen una latencia menor comparada con los machos 3xTgAD del mismo grupo; esto indica que existen diferencias significativas entre sexos aún sin efecto del tratamiento. Una prueba de Mann Whitney corroboró lo observado; las hembras 3xTgAD tienen una mediana menor (Mdn = 6.61) comparada con los machos 3xTgAD (Mdn = 33.54) ($U = 0$, $p = 0.001$). Por ello, las otras mediciones de la tarea conductual del día de la prueba se hicieron por separado (por sexos).



Gráfica 3. Diagrama de caja y bigotes muestra los datos de la prueba de Laberinto acuático de Morris. Comparación de latencias de hembras contra machos 8 meses de edad, tratamiento de agua. ■TG: 3xTgAD. * $p = 0.001$. Los bigotes representan los valores mínimos y máximos.

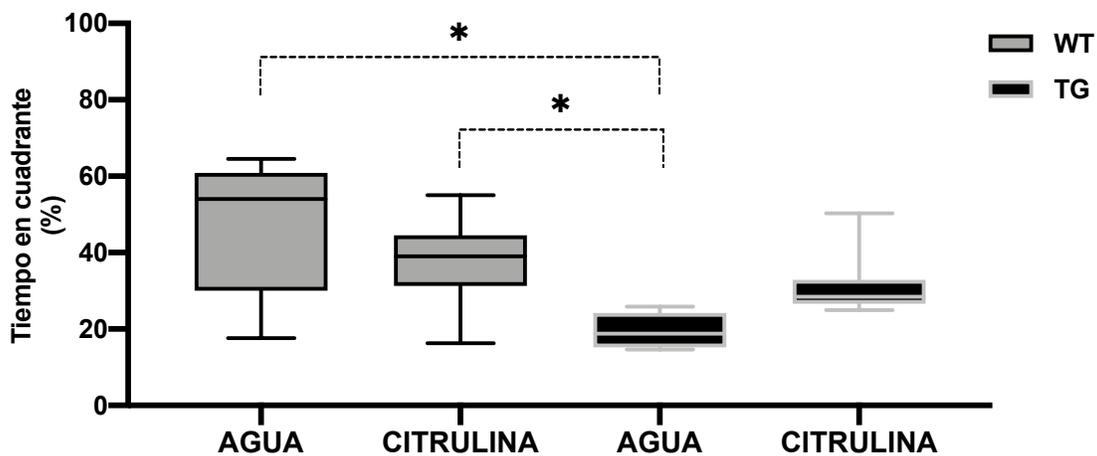
Machos de 8 meses de edad

Un primer análisis de los resultados de los machos, mostró diferencias entre cepas (gráfica 4) con los diferentes tratamientos. A simple vista se pueden observar diferencias entre los grupos, esto fue confirmado mediante la prueba estadística de Kruskal Wallis ($H(3) = 18.18, p < 0.001$); observamos que los animales 3xTgAD que recibieron el tratamiento de citrulina tienen una menor latencia (Mdn = 15.22) el día de la prueba comparados contra los 3xTgAD que recibieron agua (Mdn = 33.54) esto también fue corroborado mediante el método de False Discovery Rate (FDR) de Benjamini y Hochberg ($p = 0.017; q = 0.032$); además se encontraron diferencias significativas entre los animales 3xTgAD tratados con agua (mayor latencia) y los animales WT con el mismo tratamiento (menor latencia) ($p < 0.001; q < 0.001$). Los animales 3xTgAD con tratamiento de citrulina tuvieron latencias similares a los animales WT que no presentaron déficit cognitivo en esta tarea conductual, lo que hace que se comporten igual a los animales WT al parecer es la administración de citrulina. Por último, se observaron diferencias significativas entre los grupos 3xTgAD con el tratamiento de citrulina y los animales WT con tratamiento de agua ($p = 0.021; q = 0.032$) y entre los grupos 3xTgAD con tratamiento de agua y WT con tratamiento de citrulina ($p = 0.004; q = 0.011$).



Gráfica 4. Diagrama de caja y bigotes muestra los datos de la prueba de Laberinto acuático de Morris. Latencia en segundos. Machos 8 meses de edad. □ WT: Wild Type, ■ TG: 3xTgAD. * $p < 0.001$, * $p < 0.001$, * $p = 0.011$, * $p = 0.032$. Línea punteada diferencias entre cepas, línea continua diferencias entre tratamiento. Los bigotes representan los valores mínimos y máximos.

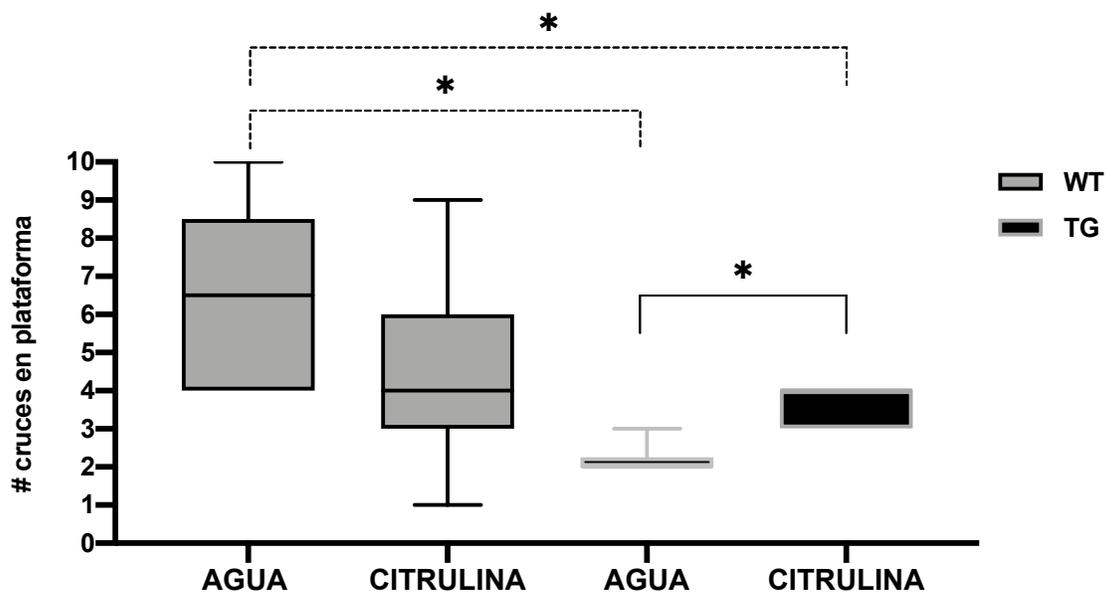
Por otra parte, se realizó la determinación del porcentaje de tiempo que los animales pasaron en el cuadrante donde se encontraba la plataforma; en la gráfica 5 observamos diferencias entre grupos, lo cual fue confirmado mediante la prueba estadística de Kruskal Wallis ($H(3) = 16.59, p < 0.001$), para determinar entre qué grupos estaban dadas estas diferencias, usamos el método de False Discovery Rate (FDR) de Benjamini y Hochberg y encontramos diferencias significativas entre los grupos control 3xTgAD y WT ($p < 0.001; q < 0.001$). Además encontramos diferencias entre los grupos 3xTgAD con tratamiento de agua y WT con tratamiento de citrulina ($p = 0.001; q = 0.003$), en la gráfica podemos observar diferencias entre el grupo de animales 3xTgAD con tratamiento de citrulina y el grupo de 3xTgAD con tratamiento de agua, sin embargo éstas diferencias no alcanzaron a ser estadísticamente significativas ($p = 0.057$). Aunque sí pudimos observar una tendencia a la mejora (aumento en el tiempo en cuadrante) en la memoria a largo plazo en los animales 3xTgAD a los que se les administró citrulina.



Gráfica 5. Diagrama de caja y bigotes muestra los datos de la prueba de Laberinto acuático de Morris. Tiempo en cuadrante (en porcentaje). Machos 8 meses de edad. □ WT: Wild Type, ■ TG: 3xTgAD. * $p < 0.001$, * $p < 0.001$, * $p = 0.003$. Línea punteada diferencias entre cepas. Los bigotes representan los valores mínimos y máximos.

Al analizar el número de cruces que los animales hicieron durante la prueba sobre el lugar donde fue colocada la plataforma los días anteriores, encontramos mediante la prueba estadística de Kruskal Wallis diferencias significativas entre grupos ($H(3) = 18.42, p < 0.001$), el método de False Discovery Rate (FDR) de

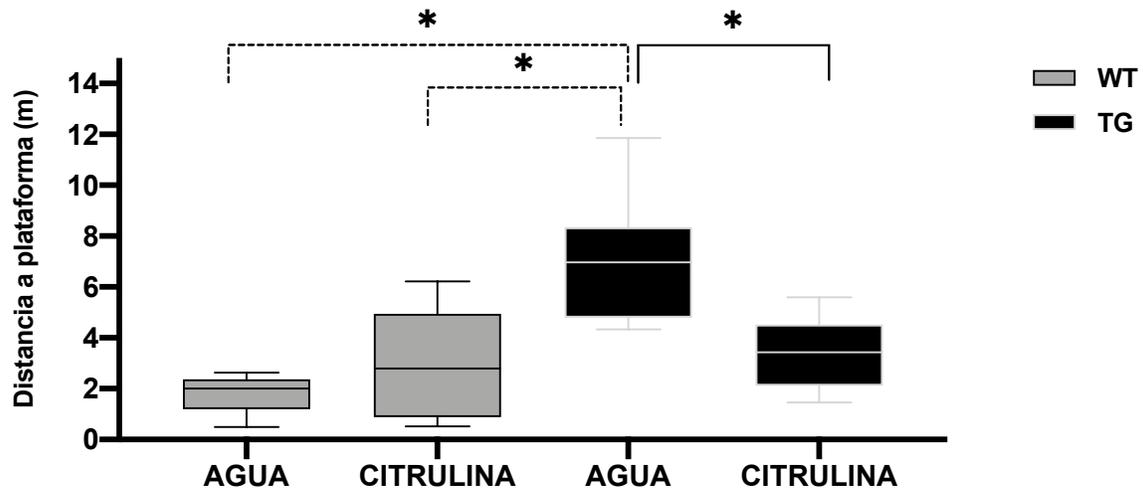
Benjamini y Hochberg muestra diferencias entre los grupos 3xTgAD con tratamiento de agua y los animales WT con el mismo tratamiento ($p < 0.001$; $q < 0.001$), entre los grupos WT con tratamiento de agua y 3xTgAD con tratamiento de citrulina ($p = 0.010$; $q = 0.019$), entre los grupos 3xTgAD con tratamiento de agua y WT con tratamiento de citrulina ($p = 0.007$; $q = 0.019$), así como diferencias significativas entre los grupos 3xTgAD con tratamiento de citrulina y 3xTgAD con tratamiento de agua ($p = 0.033$; $q = 0.049$) como se puede ver en la gráfica 6. Estos resultados sugieren un efecto positivo del tratamiento con citrulina en la memoria a largo plazo de los machos 3xTgAD.



Gráfica 6. Diagrama de caja y bigotes muestra los datos de la prueba de Laberinto acuático de Morris. Número de cruces sobre el lugar donde se encontraba la plataforma. Machos 8 meses de edad. □ WT: Wild Type, ■ TG: 3xTgAD. * $p < 0.001$, * $p < 0.001$, * $p = 0.026$, * $p = 0.017$. * $p = 0.026$. Línea punteada diferencias entre cepas, línea continua diferencias entre tratamiento. Los bigotes representan los valores mínimos y máximos.

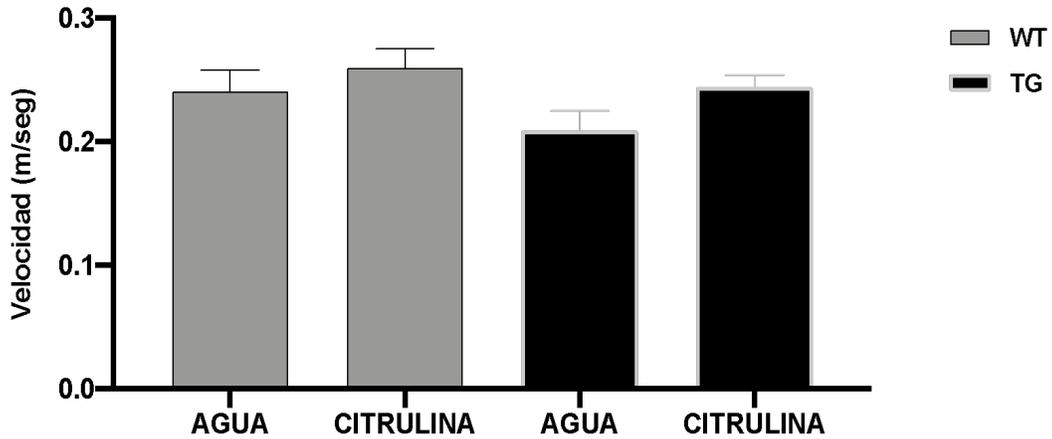
Además, se realizó la determinación de la distancia recorrida (metros) por el animal el día de la prueba antes de llegar al lugar en donde se encontraba la plataforma los días anteriores, los resultados obtenidos se pueden observar en la gráfica 7. Existen diferencias entre los grupos de acuerdo a la prueba estadística de Kruskal Wallis ($H(3) = 14.76$, $p < 0.002$), el método de False Discovery Rate (FDR) de Benjamini y Hochberg muestra que los animales 3xTgAD que recibieron el tratamiento de citrulina muestran una menor distancia recorrida para encontrar el lugar donde se colocó la plataforma durante los días de entrenamiento cuando los comparamos contra los animales que recibieron el tratamiento de agua de la misma cepa ($p = 0.024$; $q =$

0.048); además observamos diferencias entre los grupos 3xTgAD con el tratamiento de agua y el WT con el mismo tratamiento ($p < 0.001$; $q = 0.001$) y entre los 3xTgAD con el tratamiento de agua y el WT con tratamiento de citrulina ($p = 0.004$; $q = 0.012$).



Gráfica 7. Diagrama de caja y bigotes muestra los datos de la prueba de Laberinto acuático de Morris. Distancia recorrida (en metros) antes de llegar al lugar donde se encontraba la plataforma. Machos 8 meses de edad. □ WT: Wild Type, ■ TG: 3xTgAD. * $p < 0.002$, * $p = 0.001$, * $p = 0.012$, * $p = 0.048$. Línea punteada diferencias entre cepas, línea continua diferencias entre tratamiento. Los bigotes representan los valores mínimos y máximos.

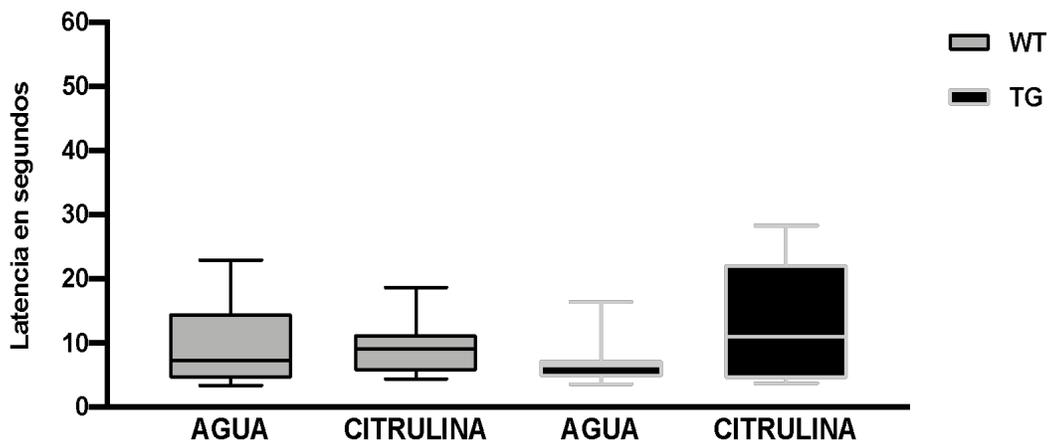
Por último, se evaluó la velocidad promedio de los diferentes grupos y tratamientos; en la gráfica 8 se puede observar la velocidad promedio de cada grupo, la prueba estadística de Kruskal-Wallis indica que no existen diferencias significativas entre grupos ($H(3) = 6.16$, $p = 0.104$). Con lo anterior pudimos corroborar primero que no existe diferencia en el desempeño motriz entre ambas cepas y segundo que el efecto observado en la conducta debido a la administración de citrulina en estos animales fue debido a cambios en el desempeño motor o la velocidad de nado de estos animales; el efecto observado es sobre la memoria a largo plazo.



Gráfica 8. Gráfica de barras muestra los datos de la prueba de Laberinto acuático de Morris. Velocidad promedio de nado el día de la prueba. Machos 8 meses de edad. □WT: Wild Type, ■TG: 3xTgAD. Las barras representan el error estándar.

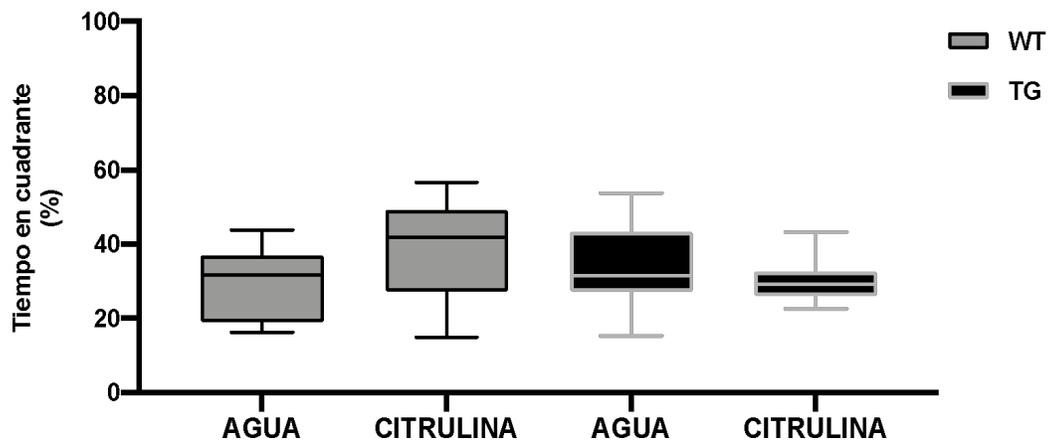
Hembras de 8 meses de edad

En el caso de las hembras no se observaron diferencias significativas en los tiempos de latencia entre cepas y tratamientos el día de la prueba (gráfica 9), lo cuál se corroboró mediante la prueba estadística de Kruskal Wallis ($H(3) = 1.65, p > 0.646$) esto sugiere que las hembras 3xTgAD no presentan déficit cognitivo en esta tarea espacial a esta edad al compararlas con su grupo control. El método de False Discovery Rate (FDR) de Benjamini y Hochberg corroboró que no existen diferencias entre los grupos.



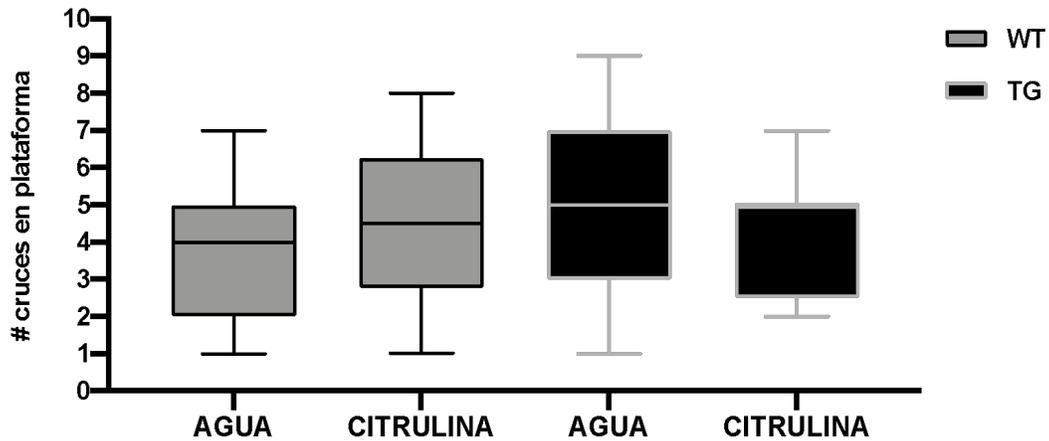
Gráfica 9. Diagrama de caja y bigotes muestra los datos de la prueba de Laberinto acuático de Morris. Latencia en segundos. Hembras 8 meses de edad. □WT: Wild Type, ■TG: 3xTgAD. Los bigotes representan los valores mínimos y máximos.

Del mismo modo que en los machos se determinó el porcentaje de tiempo que los diferentes grupos de hembras pasaron en el cuadrante donde se encontraba la plataforma durante los días de entrenamiento, la prueba estadística de Kruskal Wallis mostró que no existen diferencias significativas entre los grupos ($H(3) = 3.73, p > 0.292$), el método de False Discovery Rate (FDR) de Benjamini y Hochberg corroboró que no existen diferencias significativas entre los grupos (Gráfica 10).



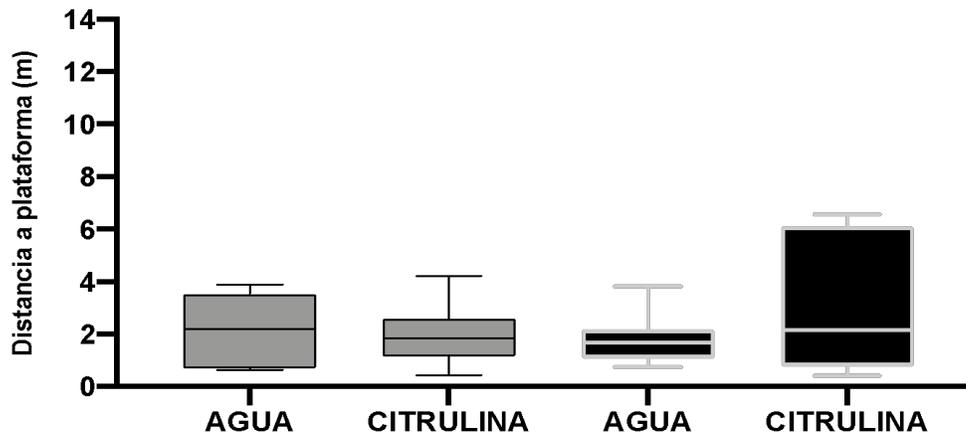
Gráfica 10. Diagrama de caja y bigotes muestra los datos de la prueba de Laberinto acuático de Morris. Tiempo en cuadrante (en porcentaje). Hembras 8 meses de edad. □WT: Wild Type, ■TG: 3xTgAD. Los bigotes representan los valores mínimos y máximos.

El número de cruces también se determinó para los diferentes grupos de hembras, en la gráfica 11 podemos observar que no existen diferencias entre los grupos, lo anterior se corroboró mediante la prueba estadística de Kruskal Wallis ($H(3) = 1.13, p > 0.768$), el método de False Discovery Rate (FDR) de Benjamini y Hochberg tampoco mostró diferencias significativas entre los grupos.



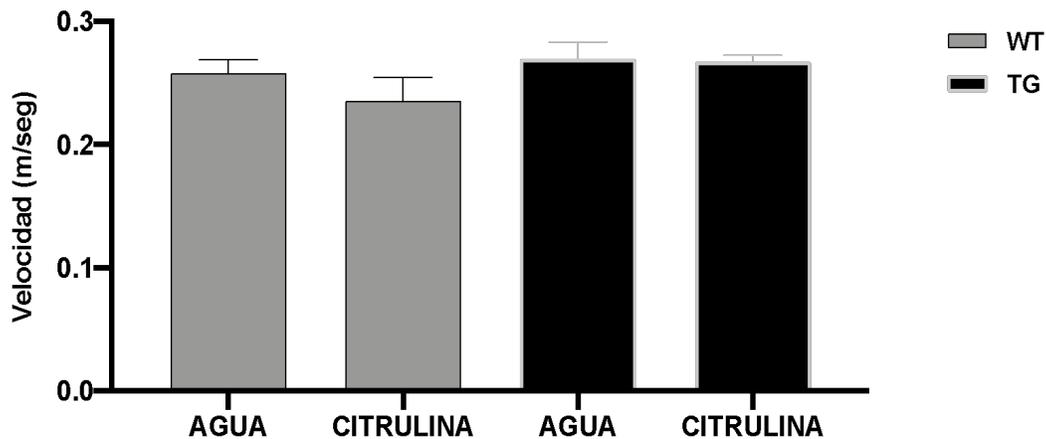
Gráfica 11. Diagrama de caja y bigotes muestra los datos de la prueba de Laberinto acuático de Morris. Número de cruces sobre el lugar donde se encontraba la plataforma. Hembras 8 meses de edad. □WT: Wild Type, ■TG: 3xTgAD. Los bigotes representan los valores mínimos y máximos.

La determinación de la distancia recorrida (metros) por el animal el día de la prueba antes de llegar al lugar en donde se encontraba la plataforma los días anteriores, se analizó como se hizo con los machos de ambas cepas; los resultados obtenidos se pueden observar en la gráfica 12; no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos según la prueba estadística de Kruskal Wallis ($H(3) = 0.644$, $p > 0.0886$) el método de False Discovery Rate (FDR) de Benjamini y Hochberg corroboró este resultado.



Gráfica 12. Diagrama de caja y bigotes muestra los datos de la prueba de Laberinto acuático de Morris. Distancia recorrida (en metros) antes de llegar al lugar donde se encontraba la plataforma. Hembras 8 meses de edad. □WT: Wild Type, ■TG: 3xTgAD. Los bigotes representan los valores mínimos y máximos.

Como se hizo con los machos la determinación de la velocidad promedio se realizó también en las hembras; como se observó en los machos las hembras tampoco muestran diferencias en la velocidad de nado ($H(3) = 1.547$, $p > 0.671$) (Gráfica 13).



Gráfica 13. Diagrama de caja y bigotes muestra los datos de la prueba de Laberinto acuático de Morris. Velocidad promedio de nado el día de la prueba. Hembras 8 meses de edad. □ WT: Wild Type, ■ TG: 3xTgAD. Las barras representan el error estándar.

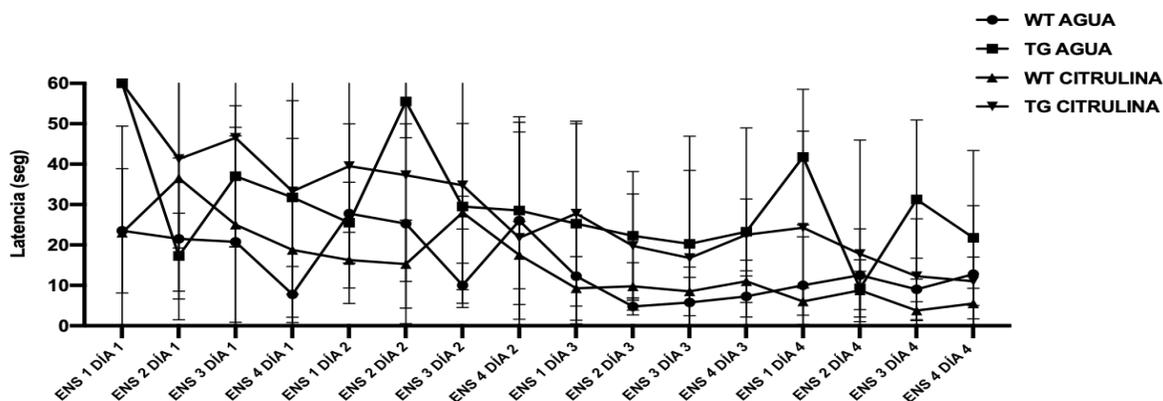
Igual que los machos estos resultados nos corroboran que no existe diferencia en el desempeño motriz entre ambas cepas y que el efecto que el tratamiento con citrulina pudo haber tenido en estos animales no es debido a cambios en el desempeño motriz o la velocidad de nado; sin embargo a diferencia de los machos el efecto que pudo haber tenido la citrulina sobre la memoria a largo plazo en éstas hembras no pudo ser observado debido a que de inicio las hembras transgénicas no presentaron déficit cognitivo en esta tarea conductual a esta edad.

Debido a que no se encontraron diferencias significativas en el desempeño conductual de las hembras 3xTgAD comparadas con su control las hembras WT, podemos sugerir que las hembras 3xTgAD no presentan déficit cognitivo a esta edad en esta tarea conductual por lo tanto el efecto que pudiera tener el tratamiento con citrulina sobre el déficit cognitivo en las hembras del modelo 3xTgAD no pudo ser determinado por que no existe el mismo.

Machos de 12 meses de edad

Con el fin de conocer el efecto de la administración de citrulina en una etapa más avanzada de la enfermedad en el modelo murino 3xTgAD, decidimos administrar a otros cuatro grupos de animales con la misma dosis (1g/kg/día) pero iniciando el tratamiento a los 9 meses de edad, con la misma duración (3

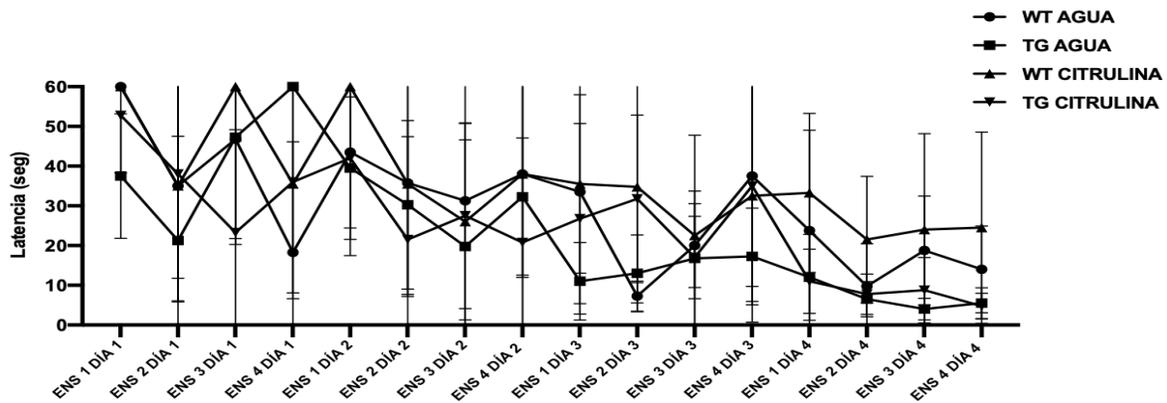
meses) que tuvo el tratamiento con citrulina en el grupo más joven; sin embargo a diferencia del grupo más joven, en estos grupos la n fue de cuatro animales por tratamiento, por sexo; los animales de 12 meses de edad fueron entrenados y probados en el laberinto acuático de Morris. Durante el entrenamiento, todos los grupos de 12 meses de edad (3xTgAD y WT, de ambos tratamientos y ambos sexos), redujeron su latencia de escape (tiempo que tarda un animal en llegar a la plataforma desde cualquier punto de la tina donde haya sido puesto). Realizamos el mismo análisis que en el grupo más joven de ensayo (4 ensayos) por día (4 días) de machos de ambas cepas (3xTgAD o WT) con los dos tratamientos (citrulina o agua), se observó una disminución de la latencia (en segundos) de los animales a través de los ensayos y los días (gráfica 14). Éste decremento en la latencia se corroboró mediante el análisis estadístico de ANOVA de repetidas medidas; observamos una disminución en la latencia durante los ensayos ($F(11.14) = 4.40, p < 0.001$); no observamos diferencia en la latencia entre las cepas durante los ensayos ($F(1.154) = 10.49, p < 0.05$) tampoco observamos algún efecto en la latencia debido al tratamiento (citrulina o agua) durante los ensayos ($F(1.154) = 0.11, p > 0.05$).



Gráfica 14. Aprendizaje en el Laberinto acuático de Morris. Machos 12 meses de edad. TG: 3xTgAD, WT: Wild type, ■TG agua, ▲ WT citrulina, ▼TG citrulina, ● WT agua, ENS: ensayos. $p < 0.001$. Los símbolos representan las medias y las barras el error estándar.

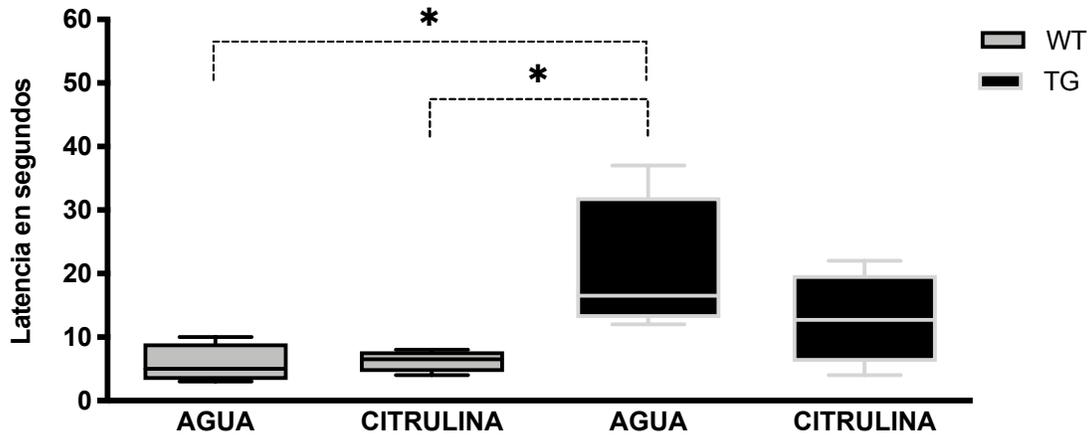
Lo mismo se obtuvo en las hembras de ambas cepas con los mismos tratamientos, un decremento en la latencia a través de los ensayos y los días de entrenamiento; lo cual fue corroborado mediante una ANOVA de repetidas medidas; disminución significativa de la latencia durante los ensayos ($F(11.14) = 4.04, p < 0.001$); no observamos ninguna diferencia en la latencia entre las cepas durante los ensayos ($F(1.154) =$

1.40, $p > 0.05$); ni tampoco algún efecto en la latencia debido al tratamiento (citrulina o agua) durante los ensayos $F(1.154) = 0.44$, $p > 0.05$) (gráfica 15). Esto indica que ambas cepas con ambos tratamientos aprendieron la tarea conductual. El número de animales para todas las pruebas conductuales fue de 8 ratones por cepa (3xTgAD o WT), 4 animales por tratamiento (citrulina o agua).



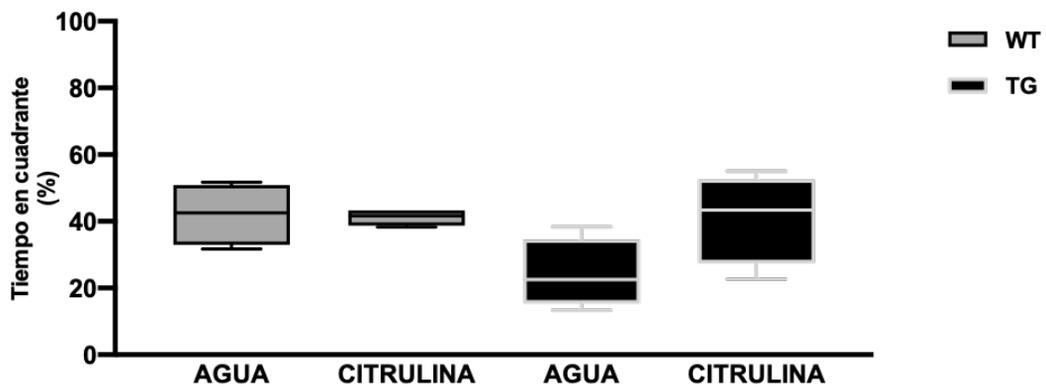
Gráfica 15. Aprendizaje en el Laberinto acuático de Morris. Hembras 12 meses de edad. TG: 3xTgAD, WT: Wild type, ■ TG agua, ▲ WT citrulina, ▼ TG citrulina, ● WT agua, ENS: Ensayos. $p < 0.001$. Los símbolos representan las medias y las barras el error estándar.

Como se puede observar en la gráfica 16 los machos 3xTgAD administrados con citrulina muestran un decremento en la latencia el día de la prueba, similar a lo que observamos en los machos de 8 meses con el mismo tratamiento; la prueba estadística de Kruskal Wallis ($H(3) = 8.45$, $p = 0.021$) señala que existen diferencias entre los grupos, el método de False Discovery Rate (FDR) de Benjamini y Hochberg señala diferencias significativas entre grupos 3xTgAD con tratamiento de agua y WT con el mismo tratamiento ($p = 0.029$) y entre el grupo 3xTgAD con tratamiento de agua y el grupo WT con tratamiento de citrulina ($p < 0.029$). Sin embargo a diferencia de los grupos de machos 3xTgAD de 8 meses de edad ya no obtuvimos diferencias significativas entre tratamientos en los machos 3xTgAD de 12 meses de edad ($p = 0.486$).



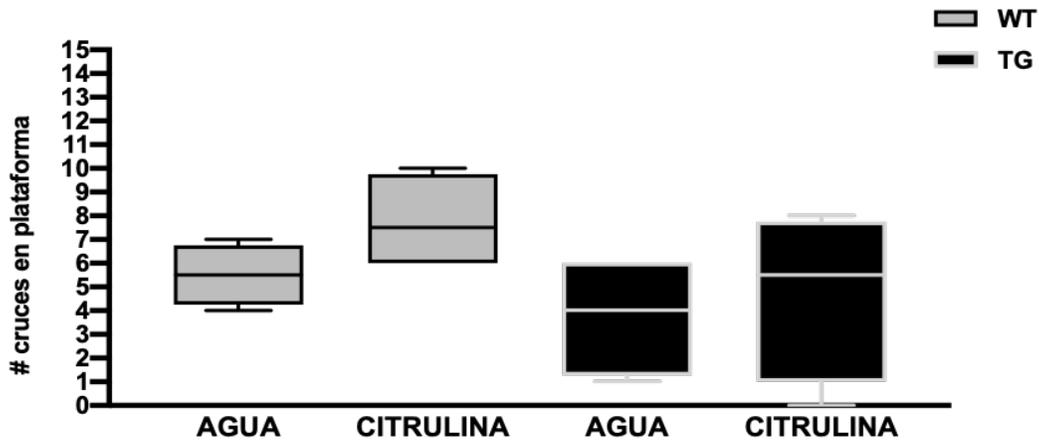
Gráfica 16. Diagrama de caja y bigotes muestra los datos de la prueba Laberinto acuático de Morris. Latencia en segundos. Machos 12 meses de edad. * $p < 0.05$, □ WT: Wild Type, ■ TG: 3xTgAD. Línea punteada diferencias entre cepas. Los bigotes representan los valores mínimos y máximos.

Como en el caso de los machos de 8 meses de edad, realizamos la determinación del porcentaje de tiempo que los animales de 12 meses de edad pasaron en el cuadrante donde se encontraba la plataforma; aunque en la gráfica 17 observamos un ligero incremento del tiempo en cuadrante de los machos 3xTgAD que recibieron el tratamiento con citrulina respecto a los machos 3xTgAD que recibieron agua, no existen diferencias significativas entre grupos, lo cual fue confirmado mediante la prueba estadística de Kruskal Wallis ($H(3) = 5.64, p = 0.125$).



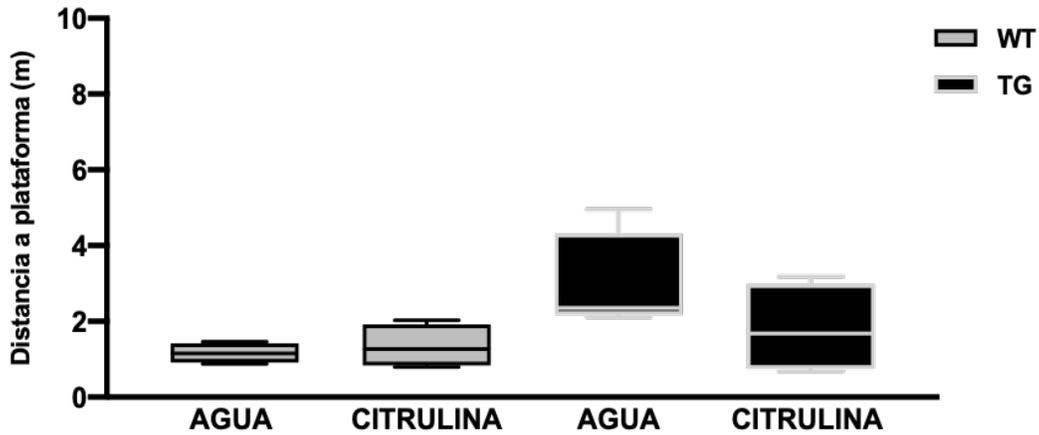
Gráfica 17. Diagrama de caja y bigotes muestra los datos de la prueba de Laberinto acuático de Morris. Tiempo en cuadrante (en porcentaje). Machos 12 meses de edad. □ WT: Wild Type, ■ TG: 3xTgAD. Los bigotes representan los valores mínimos y máximos.

Analizamos también el número de cruces que los animales de 12 meses hicieron durante la prueba sobre el lugar donde fue colocada la plataforma los días anteriores, a pesar de que en la gráfica 18 se puede observar un mayor número de cruces de los ratones WT comparados con los ratones 3xTgAD, la prueba estadística de Kruskal Wallis indica que no existen diferencias significativas entre grupos ($H(3) = 4.03, p = 0.273$).



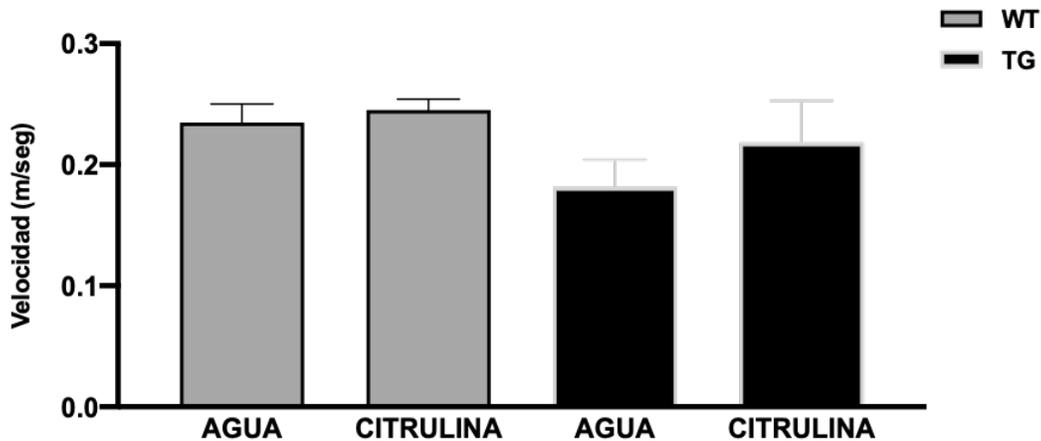
Gráfica 18. Diagrama de caja y bigotes muestra los datos de la prueba de Laberinto acuático de Morris. Número de cruces sobre el lugar donde se encontraba la plataforma. Machos 12 meses de edad. □ WT: Wild Type, ■ TG: 3xTgAD. Los bigotes representan los valores mínimos y máximos.

Además, realizamos la determinación de la distancia recorrida (metros) por el animal el día de la prueba antes de llegar al lugar en donde se encontraba la plataforma los días anteriores, los resultados obtenidos se pueden observar en la gráfica 19. No existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de acuerdo a la prueba estadística de Kruskal Wallis ($H(3) = 5.58, p = 0.130$).



Gráfica 19. Diagrama de caja y bigotes muestra los datos de la prueba de Laberinto acuático de Morris. Distancia recorrida (en metros) antes de llegar al lugar donde se encontraba la plataforma. Machos 12 meses de edad. □WT: Wild Type, ■TG: 3xTgAD. Los bigotes representan los valores mínimos y máximos.

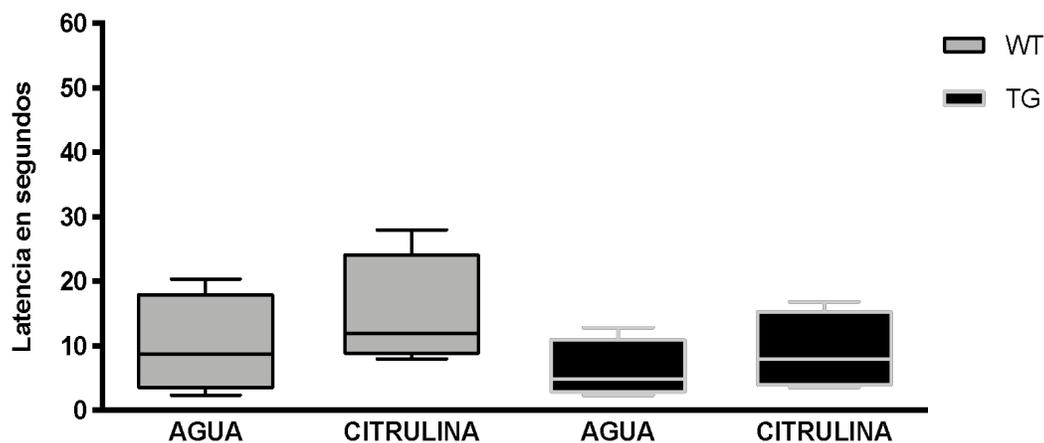
Por último, evaluamos la velocidad promedio de los diferentes grupos y tratamientos; en la gráfica 20 se puede observar la velocidad promedio de cada grupo, la prueba estadística de Kruskal-Wallis indica que no existen diferencias significativas entre grupos ($H(3) = 5.74$, $p = 0.111$). Con lo anterior podemos corroborar que no existen diferencias en el desempeño motriz entre ambas cepas.



Gráfica 20. Gráfica de barras muestra los datos de la prueba de Laberinto acuático de Morris. Velocidad promedio de nado el día de la prueba. Machos 12 meses de edad. □WT: Wild Type, ■TG: 3xTgAD. Las barras representan el error estándar.

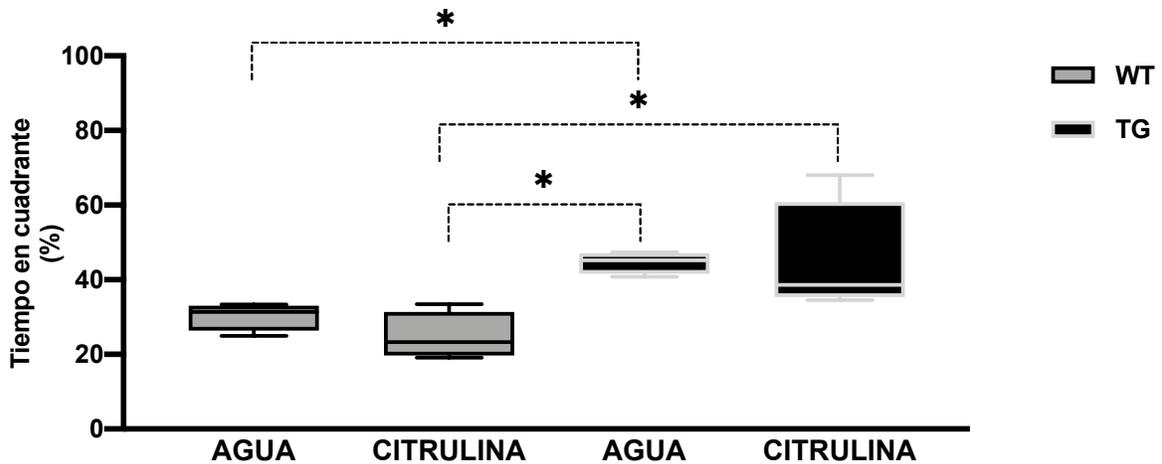
Hembras de 12 meses de edad

En el caso de las hembras se observó un comportamiento similar al grupo joven (8 meses de edad) para la cepa 3xTgAD; no se observaron diferencias significativas en las latencias entre cepas y tratamientos el día de la prueba (gráfica 21), lo cuál se corroboró mediante la prueba estadística de Kruskal Wallis ($H(3) = 2.73$, $p = 0.464$).



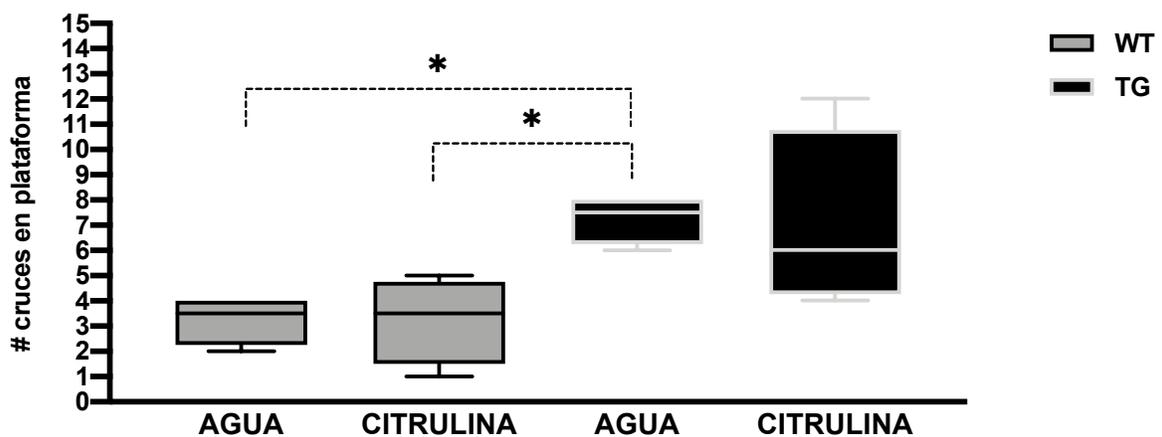
Gráfica 21. Diagrama de caja y bigotes muestra los datos de la prueba Laberinto acuático de Morris. Latencia en segundos. Hembras 12 meses de edad. □WT: Wild Type, ■TG: 3xTgAD. Los bigotes representan los valores mínimos y máximos.

Del mismo modo que en los machos, determinamos el porcentaje de tiempo que los diferentes grupos de hembras de 12 meses de edad pasaron en el cuadrante donde se encontraba la plataforma durante los días de entrenamiento, la prueba estadística de Kruskal Wallis mostró que existen diferencias significativas entre los grupos ($H(3) = 11.85$, $p = 0.001$), con el método de False Discovery Rate (FDR) de Benjamini y Hochberg determinamos diferencias significativas entre los grupos WT con el tratamiento de agua y el grupo 3xTgAD con el mismo tratamiento, ($p = 0.014$; $q = 0.043$), diferencias entre los grupos WT con tratamiento de citrulina y los 3xTgAD con tratamiento de agua ($p = 0.004$; $q = 0.023$) y diferencias entre los grupos WT con tratamiento de citrulina y 3xTgAD con el mismo tratamiento ($p = 0.021$; $q = 0.043$) (Gráfica 22).



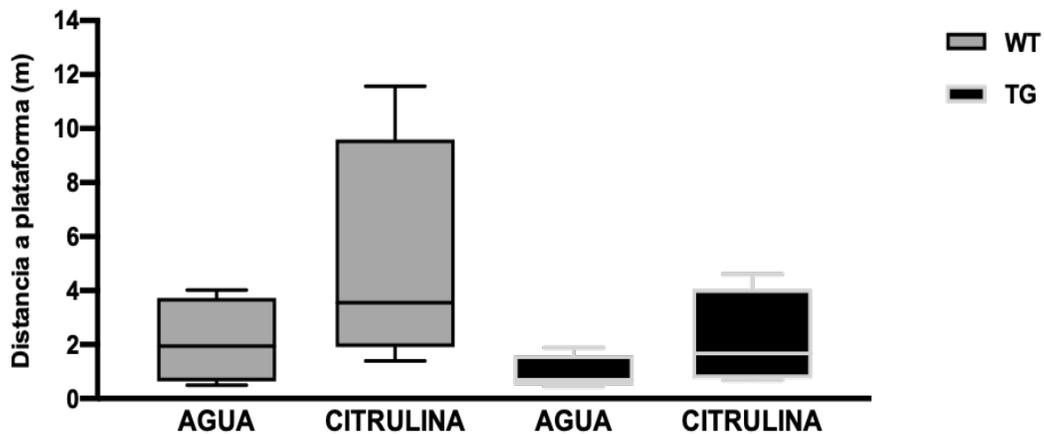
Gráfica 22. Diagrama de caja y bigotes muestra los datos de la prueba de Laberinto acuático de Morris. Tiempo en cuadrante (en porcentaje). Hembras 12 meses de edad. □ WT: Wild Type, ■ TG: 3xTgAD. $p = 0.001$, $*p = 0.043$, $*p = 0.023$, $*p = 0.043$. Línea punteada diferencias entre cepas (3xTgAD y WT). Los bigotes representan los valores mínimos y máximos.

El número de cruces se obtuvo también para los diferentes grupos de hembras de 12 meses de edad, en la gráfica 23 podemos observar diferencias entre los grupos, lo anterior se corroboró mediante la prueba estadística de Kruskal Wallis ($H(3) = 9.85$, $p = 0.005$), el método de False Discovery Rate (FDR) de Benjamini y Hochberg mostró diferencias significativas entre los grupos WT con tratamiento de agua y el grupo 3xTgAD con el mismo tratamiento ($p = 0.011$; $q = 0.049$) y diferencias también entre el grupo WT con tratamiento de citrulina y 3xTgAD con tratamiento de agua ($p = 0.016$; $q = 0.049$).



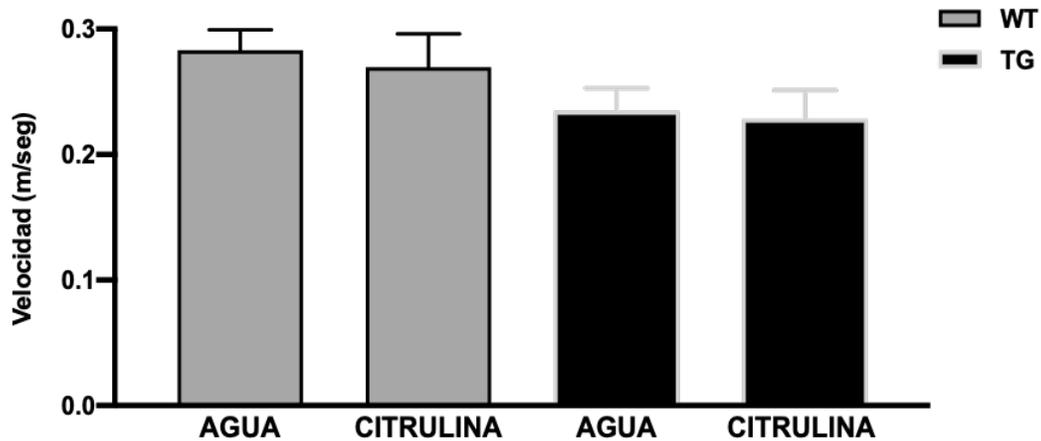
Gráfica 23. Diagrama de caja y bigotes muestra los datos de la prueba de Laberinto acuático de Morris. Número de cruces sobre el lugar donde se encontraba la plataforma. Hembras 12 meses de edad. □ WT: Wild Type, ■ TG: 3xTgAD. $p = 0.005$, $*p = 0.049$, $*p = 0.049$. Línea punteada diferencias entre cepas (3xTgAD y WT). Los bigotes representan los valores mínimos y máximos.

La determinación de la distancia recorrida (metros) por el animal el día de la prueba antes de llegar al lugar en donde se encontraba la plataforma los días anteriores fue analizada como se hizo con los machos de ambas cepas; los resultados obtenidos se pueden observar en la gráfica 24; no existen diferencias entre los grupos según la prueba estadística de Kruskal Wallis ($H(3) = 5.31$, $p = 0.151$) con el método de False Discovery Rate (FDR) de Benjamini y Hochberg corroboramos este resultado.



Gráfica 24. Diagrama de caja y bigotes muestra los datos de la prueba de Laberinto acuático de Morris. Distancia recorrida (en metros) antes de llegar al lugar donde se encontraba la plataforma. Hembras 12 meses de edad. □ WT: Wild Type, ■ TG: 3xTgAD. Los bigotes representan los valores mínimos y máximos.

Como se hizo con los machos determinamos la velocidad promedio también en las hembras, como observamos en los machos las hembras tampoco muestran diferencias en la velocidad de nado. A pesar de que la prueba estadística Kruskal Wallis indica que existen diferencias entre grupos ($H(3) = 10.21$, $p = 0.004$), al realizar el método False Discovery Rate (FDR) de Benjamini y Hochberg no se encontraron diferencias entre los grupos; cabe mencionar que la ventaja de este método es precisamente evitar la obtención de falsos positivos (Gráfica 25).

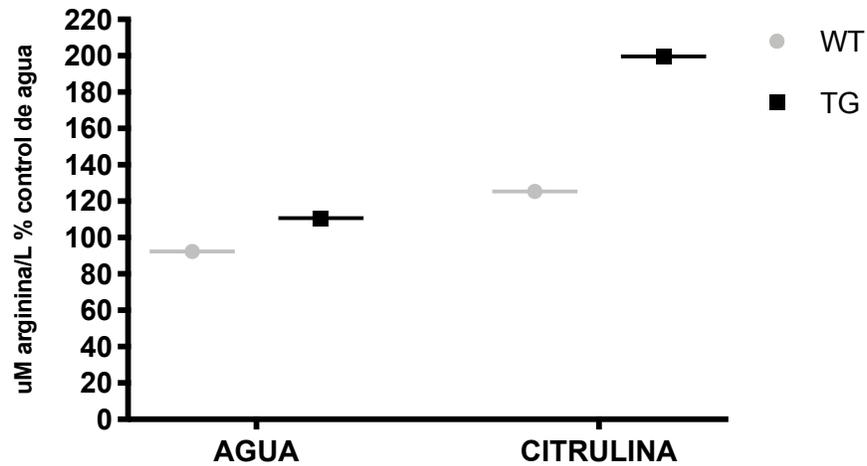


Gráfica 25. Gráfica de barras muestra los datos de la prueba de Laberinto acuático de Morris. Velocidad promedio de nado el día de la prueba. Hembras 12 meses de edad. □WT: Wild Type, ■TG: 3xTgAD. Las barras representan el error estándar.

Con base en los resultados obtenidos en los grupos de 12 meses de edad tanto machos como hembras con el tratamiento de citrulina, se decidió continuar con las pruebas de biología molecular sólo en los animales del grupo joven (8 meses) ya que fue el grupo de edad en el cual la citrulina tuvo un efecto sobre la memoria a largo plazo.

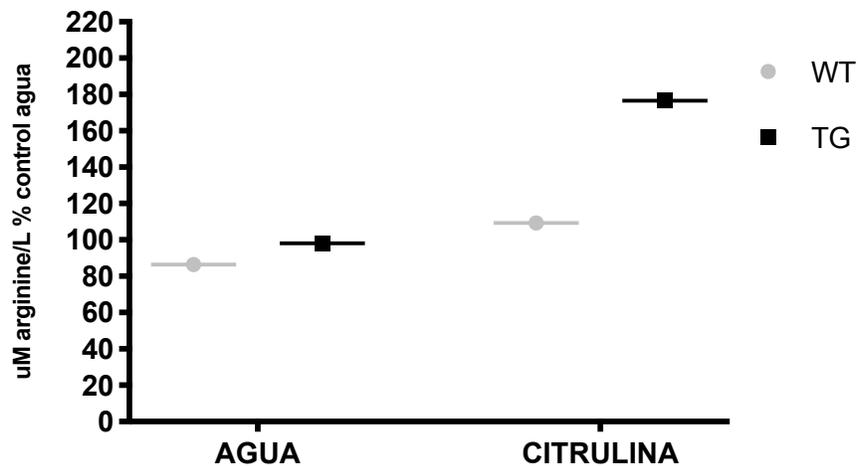
Niveles de arginina

Dado que citrulina es el precursor primario de arginina, medimos los niveles de arginina en líquido cefalorraquídeo (LCR) y tejido cerebral (hipocampo y cerebelo) para evaluar los cambios ocasionados por la administración con citrulina. Debido a que la muestra de LCR de los animales es un pull de 4 animales que corresponde a una sola medición, no se pudo realizar un análisis estadístico de los datos. Sin embargo, se determinó el porcentaje de incremento de los niveles de arginina de los animales tratados con citrulina con respecto a la cepa control (WT) con administración de agua, lo que se tomó como el 100% de arginina. Los machos 3xTgAD que recibieron administración de citrulina tuvieron un aumento en los niveles de arginina en LCR de 180% y los machos WT administrados con citrulina mostraron un aumento de 135% con respecto a los machos WT administrados con agua (gráfica 26).



Gráfica 26. Gráfica de líneas muestra los datos obtenidos de niveles de arginina en LCR. Machos 3xTgAD Y WT 8 meses de edad.
 ● WT: Wild Type, ■ TG: 3xTgAD.

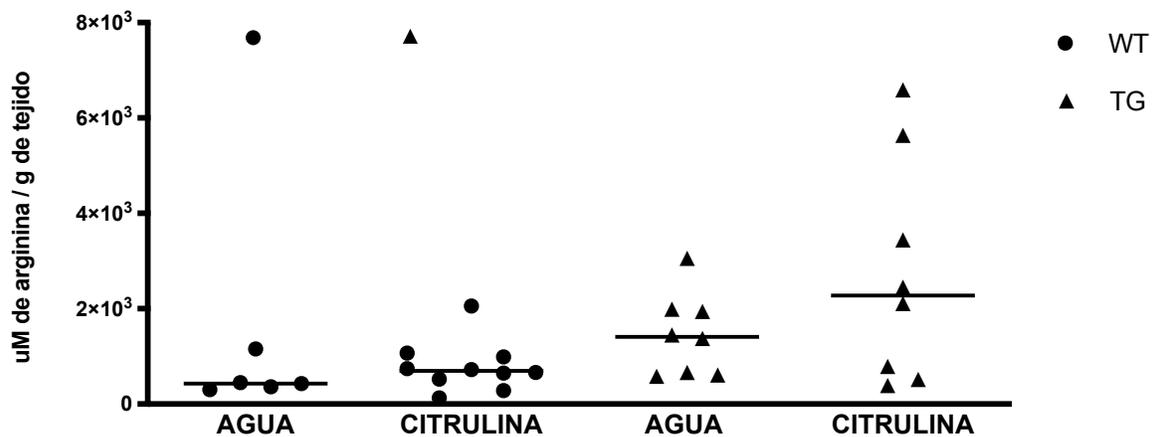
Las hembras 3xTgAD administradas con citrulina mostraron un incremento de arginina en LCR del 180%; mientras que las hembras WT administradas con citrulina exhibieron un incremento de los niveles de arginina del 126% con respecto a las hembras WT administradas con agua. Con estos resultados corroboramos que la administración de citrulina induce un aumento en los niveles de arginina en el LCR de los animales con este tratamiento y que el aumento observado tanto en hembras como en machos es similar (gráfica 27).



Gráfica 27. Gráfica de líneas muestra los datos obtenidos de niveles de arginina en LCR. Hembras 3xTgAD Y WT 8 meses de edad.
 ● WT: Wild Type, ■ TG: 3xTgAD.

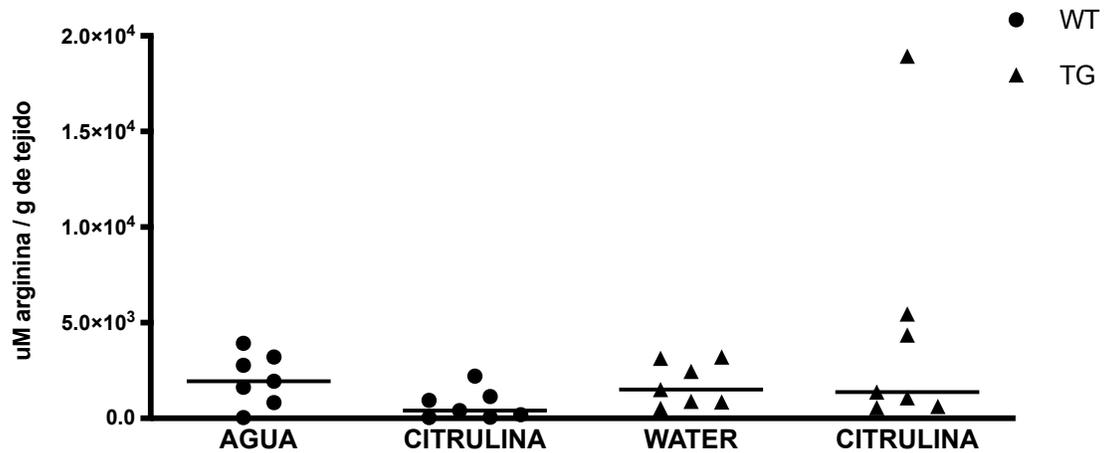
Además, medimos los niveles de arginina en hipocampo; una estructura que se sabe sufre más cambios durante esta enfermedad en este modelo, además realizamos esta medición en el cerebelo como una estructura control ya que se ha reportado que es una de las estructuras en la que suceden menos cambios durante la progresión de la enfermedad.

Los niveles de arginina en hipocampo de los machos 3xTgAD se muestran en la gráfica 28, la prueba Kruskal Wallis ($H(3) = 8.96$; $p < 0.030$) indica diferencias entre grupos; sin embargo, al realizar el método de False Discovery Rate (FDR) de Benjamini y Hochberg no encontramos diferencias significativas entre grupos, por lo tanto sólo podemos observar una tendencia al incremento en los niveles de arginina en el grupo de animales transgénicos que fueron administrados con citrulina.



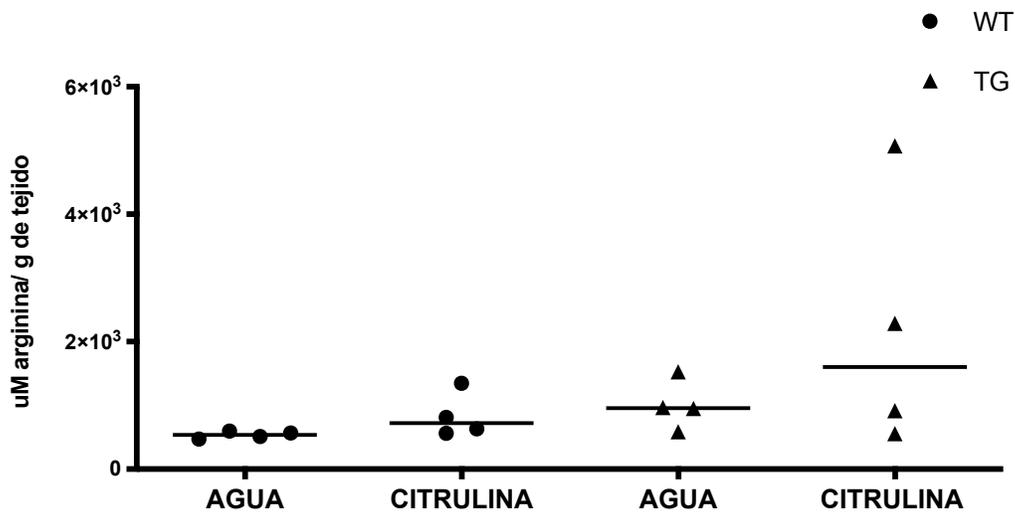
Gráfica 28. Diagrama de dispersión muestra los datos obtenidos de niveles de arginina en Hipocampo en machos 3xTgAD Y WT 8 meses de edad. ●WT: Wild Type, ▲TG: 3xTgAD. Las barras representan la mediana de los datos obtenidos.

En el caso de las hembras se observó lo mismo que en los machos, no existen diferencias en los niveles de arginina en hipocampo entre grupos ni por cepa, como se puede observar en la gráfica 29 lo cual a su vez se corroboró mediante la prueba estadística Kruskal Wallis ($H(3) = 5.35$; $p = 0.148$).

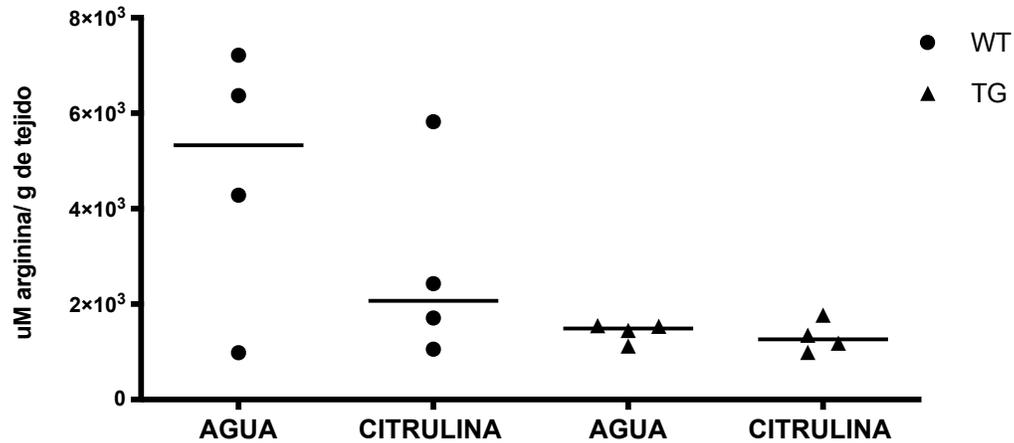


Gráfica 29. Diagrama de dispersión muestra los datos obtenidos de niveles de arginina en Hipocampo en hembras 3xTgAD Y WT 8 meses de edad. ●WT: Wild Type, ▲ TG: 3xTgAD. Las barras representan la mediana de los datos obtenidos.

La concentración de arginina en cerebelo tanto de machos (gráfica 29) prueba de Kruskal Wallis test ($H(3) = 5.97$; $p = 0.106$) como de hembras (gráfica 30) prueba de Kruskal Wallis ($H(3) = 3.11$; $p = 0.400$) de ambas cepas no presentó cambios como era esperado debido a que ésta es nuestra estructura control.



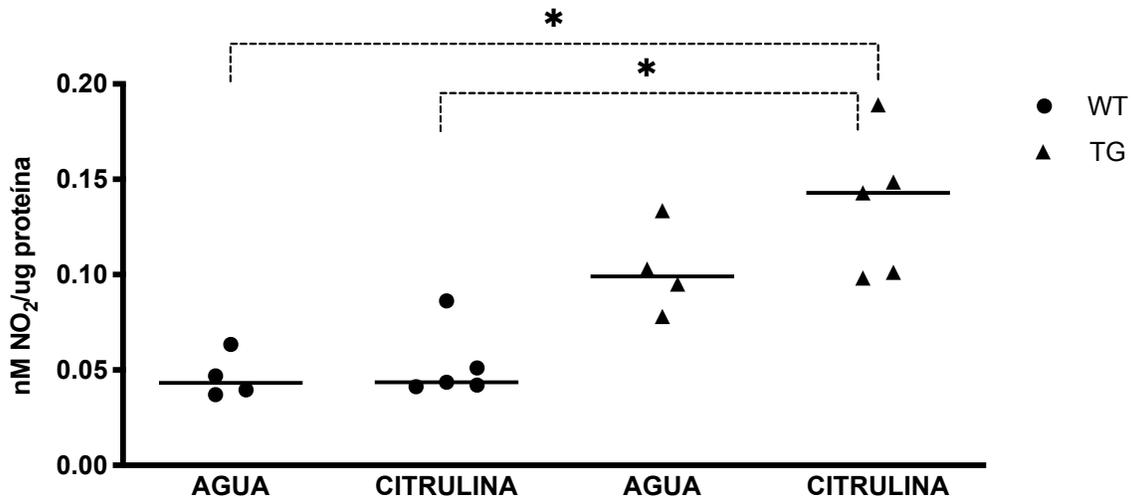
Gráfica 30. Diagrama de dispersión muestra los datos obtenidos de niveles de arginina en Cerebelo en machos 3xTgAD Y WT 8 meses de edad. ●WT: Wild Type, ▲ TG: 3xTgAD. Las barras representan la mediana de los datos obtenidos.



Gráfica 31. Diagrama de dispersión muestra los datos obtenidos de niveles de arginina en Cerebelo en hembras 3xTgAD Y WT 8 meses de edad. ● WT: Wild Type, ▲ TG: 3xTgAD. Las barras representan la mediana de los datos obtenidos.

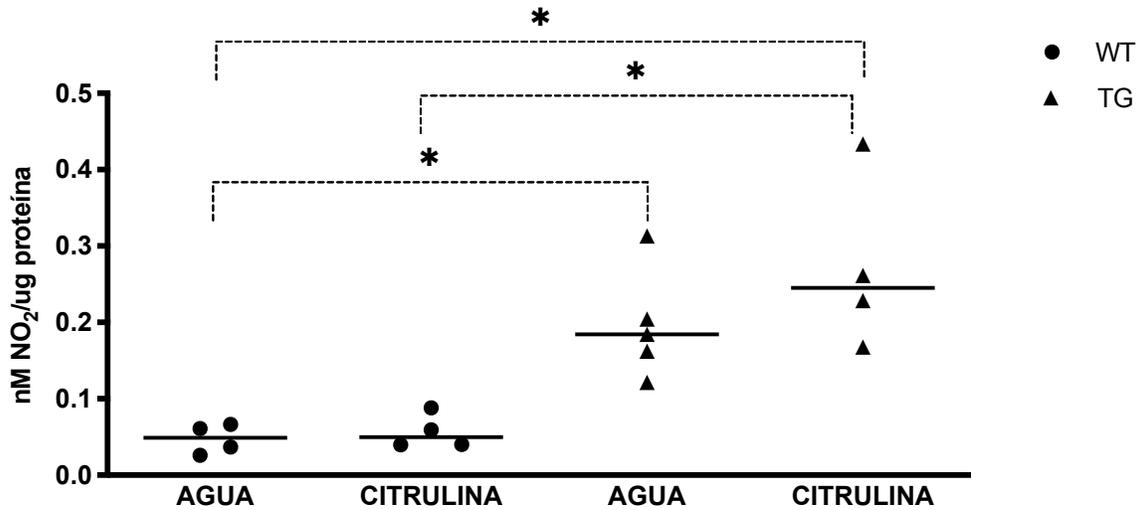
Niveles de Óxido Nítrico

Para evaluar la vía de las óxido sintasas, como una posible vía en la que se empleara la arginina derivada de la administración de citrulina, realizamos una medida indirecta de determinación de óxido nítrico mediante los niveles de nitratos y nitritos en hipocampo de los machos (gráfica 32) y hembras (gráfica 33) de ambas cepas; la prueba de Kruskal Wallis mostró que en el caso de los machos existen diferencias significativas entre los grupos ($H(3) = 13.03$, $p = 0.001$), mediante el método de False Discovery Rate (FDR) de Benjamini y Hochberg se estableció que estas diferencias se encuentran entre los grupos de machos 3xTgAD tratados con citrulina y los machos WT tratados con agua y con citrulina ($p = 0.002$; $q = 0.013$, $p = 0.005$; $q = 0.016$) respectivamente.



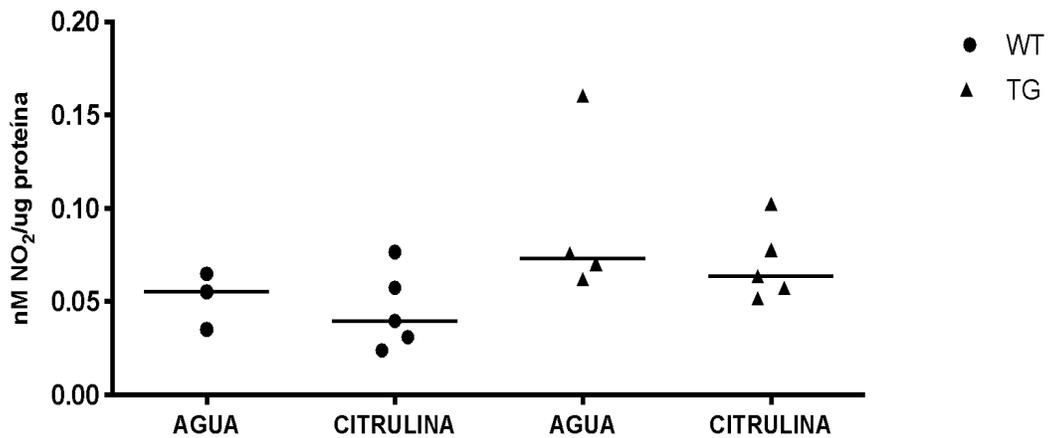
Gráfica 32. Diagrama de dispersión muestra los datos obtenidos de niveles de óxido nítrico en Hipocampo en machos 3xTgAD Y WT 8 meses de edad. ● WT: Wild Type, ▲ TG: 3xTgAD. $p = 0.001$, $*p = 0.013$, $*p = 0.016$. Línea punteada diferencias entre cepas (3xTgAD y WT). Las barras representan la mediana de los datos obtenidos.

Observamos algo similar con los niveles de nitritos en las hembras (gráfica 33); una prueba de Kruskal Wallis mostró que existen diferencias significativas entre los grupos ($H(3) = 12.52$; $p = 0.001$) y el método de False Discovery Rate (FDR) de Benjamini y Hochberg reveló que estas diferencias se encontraban entre el grupo 3xTgAD con agua y el grupo WT con el mismo tratamiento ($p = 0.018$; $q = 0.036$) y entre el grupo TG tratado con citrulina y los grupos de hembras WT de ambos tratamientos (citrulina y agua) ($p = 0.004$; $q = 0.025$, $p = 0.010$; $q = 0.029$ respectivamente).



Gráfica 33. Diagrama de dispersión muestra los datos obtenidos de niveles de óxido nítrico en Hipocampo en hembras 3xTgAD Y WT 8 meses de edad. ●WT: Wild Type, ▲TG: 3xTgAD. $p = 0.001$, * $p = 0.036$, * $p = 0.025$, * $p = 0.029$. Línea punteada diferencias entre cepas (3xTgAD y WT). Las barras representan la mediana de los datos obtenidos.

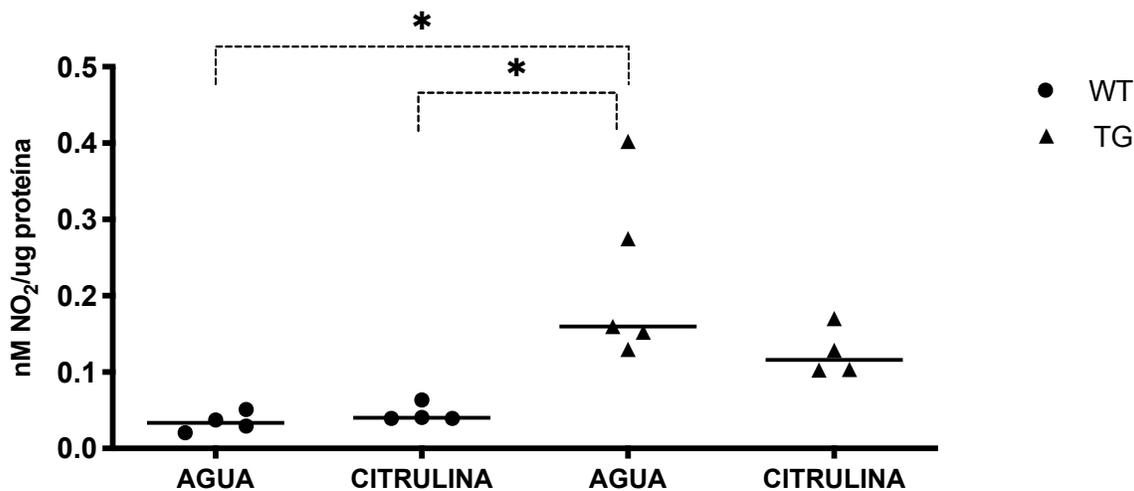
Este análisis también se hizo en la estructura control (cerebelo) en el caso de los machos como se puede observar en la gráfica 34 no existen cambios en los niveles de óxido nítrico (NO), lo cuál se corroboró mediante la prueba estadística de Kruskal Wallis ($H(3) = 5.35$; $p = 0.145$).



Gráfica 34. Diagrama de dispersión muestra los datos obtenidos de niveles de óxido nítrico en Cerebelo en machos 3xTgAD Y WT 8 meses de edad. ●WT: Wild Type, ▲TG: 3xTgAD. Las barras representan la mediana de los datos obtenidos.

En el caso de las hembras (gráfica 35) sí se observaron diferencias entre grupos, estas diferencias fueron estadísticamente significativas según la prueba estadística aplicada Kruskal Wallis ($H(3) = 13.35$; $p = 0.001$), se empleó el método de False Discovery Rate (FDR) de Benjamini y Hochberg para establecer entre qué

grupos se encontraban estas diferencias; las hembras TG con tratamiento de agua tienen diferencias con el grupo de hembras WT con el mismo tratamiento ($p < 0.001$; $q = 0.006$) existen además diferencias entre el grupo TG con tratamiento de agua y el WT con tratamiento de citrulina ($p = 0.011$; $q = 0.032$).



Gráfica 35. Diagrama de dispersión muestra los datos obtenidos de niveles de óxido nítrico en Cerebelo en hembras 3xTgAD Y WT 8 meses de edad. ● WT: Wild Type, ▲ TG: 3xTgAD. $p = 0.001$, $*p = 0.006$, $*p = 0.032$. Línea punteada diferencias entre cepas (3xTgAD y WT). Las barras representan la mediana de los datos obtenidos.

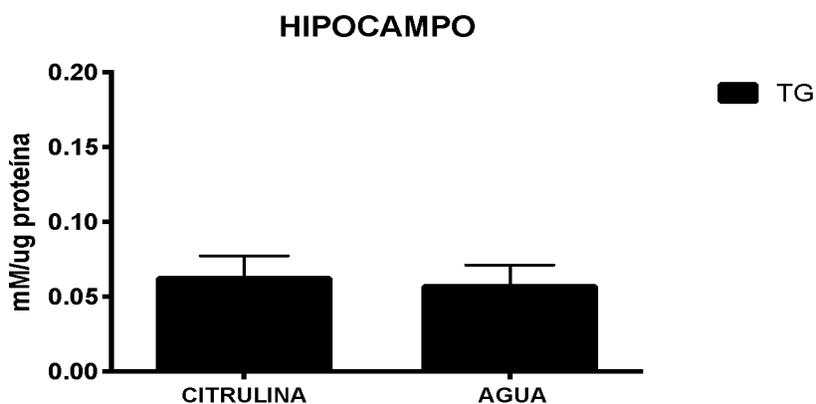
Estos resultados sugieren que las hembras 3xTgAD tienen niveles más altos de óxido nítrico en cerebro comparado con las hembras WT, aún sin haber recibido el tratamiento con citrulina.

Con el objetivo de saber si existía alguna correlación entre los niveles de arginina y el desempeño de los machos 3xTgAD en el laberinto acuático de Morris, realizamos una prueba estadística Spearman r , la cual mostró que no existe una correlación entre los niveles de arginina en hipocampo y la latencia en segundos ($r = -0.50$; $p = 0.21$); tampoco encontramos correlación entre los niveles de arginina y los niveles de nitritos ($r = -0.60$; $p = 0.35$). Lo mismo encontramos para las hembras 3xTgAD, no existe correlación entre los niveles de arginina y la latencia en segundos ($r = 0.50$; $p = 0.45$) ni entre los niveles de nitritos y arginina ($r = 0.60$; $p = 0.41$).

Niveles de Radical OH

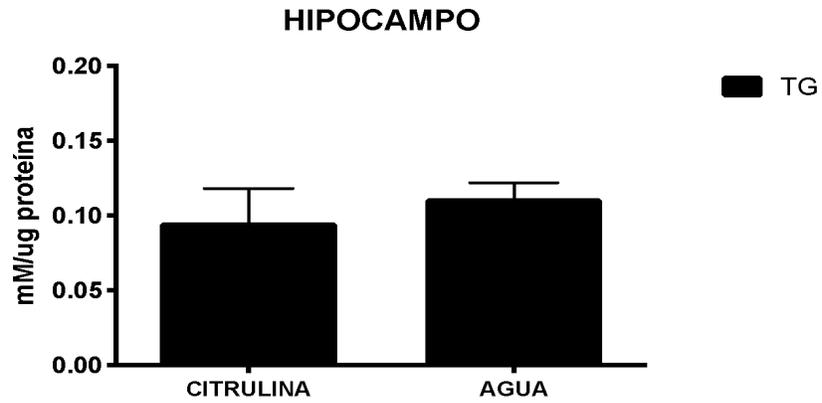
Finalmente, medimos los niveles de radical hidroxilo en el hipocampo de los ratones de ambas cepas y de ambos sexos, con ambos tratamientos (citrulina y agua) mediante el ensayo de la 2-desoxi-d-ribosa. En las gráficas 36 y 37 podemos ver los resultados obtenidos para los animales 3xTgAD machos y hembras (respectivamente); en estas gráficas no se observan los datos del grupo control que son los animales WT con ambos tratamientos ya que al realizar la cuantificación (mediante el uso de una curva estándar) en estos animales, los niveles fueron demasiado bajos para ser detectados, es decir eran valores por debajo de los niveles de la curva estándar.

Los resultados obtenidos para los machos 3xTgAD se pueden observar en la gráfica 36; los niveles entre los machos TG con ambos tratamientos son muy similares (Mdn = 0.0528, Mdn = 0.0600), la prueba de Mann-Whitney confirmó lo observado, ($U = 28, p > 0.05$), el tratamiento con citrulina en esta dosis y mediante este tipo de administración (esofágica) no induce un decremento en los niveles de radical hidroxilo.



Gráfica 36. Gráfica de barras con error estándar muestra niveles de radical hidróxilo en machos 3xTgAD de 8 meses de edad.

En el caso de las hembras 3xTgAD en los resultados obtenidos (Gráfica 37) se puede observar lo mismo que en los machos, los niveles de radical hidroxilo en el grupo de hembras que recibió el tratamiento con citrulina (Mdn = 0.1128) son similares con las hembras que recibieron el tratamiento con agua (Mdn = 0.1036); la prueba de Mann-Whitney no muestra diferencias significativas ($U = 8; p > 0.05$) entre los grupos.



Gráfica 37. Gráfica de barras con error estándar muestra niveles de radical hidróxilo en hembras 3xTgAD de 8 meses de edad.

De acuerdo con los resultados obtenidos del radical hidroxilo, el tratamiento con citrulina en esta dosis no induce un decremento significativo sobre estos niveles. Sin embargo, los niveles de radical hidroxilo en el modelo 3xTgAD en ambos sexos es mayor que los niveles en los animales WT, lo cual indica que los animales 3xTgAD presentan mayores niveles de estrés oxidativo.

10. DISCUSIÓN

La administración de citrulina durante 3 meses en los machos 3xTgAD de 5 meses de edad mejoró el desempeño conductual en la tarea espacial Laberinto acuático de Morris. Con este trabajo demostramos que el déficit cognitivo en los ratones de 8 meses de edad 3xTgAD puede ser prevenido si los animales son administrados con citrulina en una etapa temprana de la enfermedad. No observamos cambios en la adquisición de la tarea en ninguna de las cepas, por lo cual podemos sugerir que el efecto que observamos sobre tres de las cinco mediciones que realizamos para evaluar el desempeño conductual (disminución de la latencia, aumento en el número de cruces por el lugar donde se encontraba la plataforma durante el entrenamiento, disminución de la distancia recorrida antes de llegar al lugar donde se encontraba la plataforma) es sobre la consolidación de la memoria a largo plazo y no sobre el aprendizaje de la misma. Observamos diferencias significativas entre los animales 3xTgAD administrados con citrulina y los 3xTgAD que recibieron agua; los primeros reflejan una mejora en la memoria a largo plazo como consecuencia de la administración de citrulina.

Sin embargo, en la medición de porcentaje de tiempo en el cuadrante objetivo no obtuvimos diferencia estadística significativa ($p = 0.057$). Una posible explicación puede estar relacionada con el patrón temporal de búsqueda reportada en los ratones. Se ha descrito que la precisión de la búsqueda en ratones controles alcanza su punto máximo entre los 10 y los 15 segundos y posteriormente disminuye. Esta disminución en el tiempo de búsqueda sugiere que los ratones aprenden relativamente rápido que la plataforma está ausente del cuadrante donde antes se encontraba y cambian la estrategia de búsqueda, lo cual podría ocasionar que los animales se muevan hacia otros cuadrantes y que al medir el tiempo en cuadrante este se vea reducido, por lo que esta medición no necesariamente refleja un mal desempeño en la tarea (Maei *et al.*, 2009).

Además de la estrategia de búsqueda existen diversos factores como la edad, el sexo, la especie y la cepa que se ha reportado, pueden tener efecto sobre el desempeño en esta tarea conductual específica (Laberinto acuático de Morris) (D'Hooge *et al.*, 2001). Algunos estudios además indican que los ratones envejecidos tienen peor desempeño en el laberinto acuático de Morris y conductas como la flotación son más comunes en los ratones cuando estos son comparados con las ratas (Brandeis *et al.*, 1989; Lipp *et al.*,

1998). Estos factores pueden influenciar las mediciones de manera independiente e incluso afectar en la detección de diferencias entre grupos; de ahí la importancia de realizar más de una medición en la prueba de memoria, esto para tener más parámetros de referencia con los cuales podamos concluir si la administración del aminoácido tuvo un efecto sobre la memoria; en nuestro caso las medidas indican que el efecto que obtuvimos después de la de administración de citrulina durante 3 meses es positivo y es sobre la memoria a largo plazo, ya que no obtuvimos diferencias en la velocidad promedio de nado (la quinta medición en la que no encontramos diferencias entre grupos) entre cepas ni entre tratamientos, por lo cual sabemos que el efecto que observamos en los grupos administrados con citrulina no se debe a una mejora en el desempeño motor.

En este trabajo encontramos diferencias estadísticamente significativas en tres de las cinco mediciones realizadas, lo cual indica un efecto positivo de la administración de citrulina sobre la memoria a largo plazo en los animales 3xTgAD; en contraste con los machos 3xTgAD, las hembras de la misma cepa no presentan déficit cognitivo en ninguno de los dos grupos de edad (8 y 12 meses), por lo que no pudimos evaluar el efecto de la administración de citrulina sobre la memoria a largo plazo.

Respecto a las diferencias en el desempeño conductual entre sexo de los animales 3xTgAD que nosotros observamos ya se han reportado diferencias en el desempeño de ciertas tareas entre sexos de esta misma cepa, en tareas conductuales como el laberinto acuático de Morris, evitación inhibitoria y reconocimiento de objeto novedoso; en el caso del laberinto acuático de Morris se ha reportado que en la versión con claves los animales 3xTgAD de 4 meses de edad no presentan déficit; a los 2 y 4 meses de edad los ratones 3xTgAD hembras y machos se desempeñan de manera comparable en tareas dependientes de hipocampo, corteza y amígdala según lo medido en las tareas conductuales de reconocimiento de objeto novedoso, evitación inhibitoria y laberinto acuático de Morris (sin clave); sin embargo, en este mismo trabajo reportan diferencias cognitivas dependientes del sexo que se presentan a los 6 meses de edad, un peor desempeño de las hembras 3xTgAD en la evitación inhibitoria y en el laberinto acuático de Morris; estas diferencias cognitivas ya no fueron observadas en los machos y hembras 3xTgAD de 15 meses de edad; en resumen las hembras tienen un peor desempeño comparadas con los machos a la edad de 6 y 9 meses en el laberinto

acuático de Morris, sin embargo, no observaron diferencias entre sexos a las edades de 2, 4, 12 ó 15 meses. (Clinton *et al.*, 2007). A diferencia de lo reportado en este trabajo, nosotros encontramos un mejor desempeño en las hembras 3xTgAD en el laberinto acuático de Morris mostrando una menor latencia de escape el día de la prueba, mayor porcentaje de tiempo en el cuadrante donde se encontraba la plataforma durante el entrenamiento, mayor número de cruces por el lugar donde se encontraba la plataforma durante el entrenamiento y menor distancia recorrida antes de encontrar la plataforma.

Se han reportado inconsistencias en esta cepa entre sexos y los resultados dependen de la tarea conductual que se emplea y de la edad de los animales (Stover *et al.*, 2015) lo que infiere ciertas limitaciones al trabajar con este modelo murino. Stover y colaboradores evaluaron el desempeño de animales de la cepa 3xTgAD en diferentes pruebas conductuales (laberinto Y de alternancia espontánea, reconocimiento de objeto novedoso, laberinto de Barnes y condicionamiento contextual al miedo con clave) y encontraron que en el laberinto de Barnes los ratones 3xTgAD tanto machos como hembras de 6.5 meses de edad muestran déficit en el aprendizaje espacial y la memoria; sin embargo, reportaron que las hembras se mueven más rápido que los machos por lo cual observaron menor latencia en las hembras comparadas con los machos, los machos mostraron un peor desempeño comparados con las hembras. Por su parte, en la tarea de condicionamiento contextual al miedo no encontraron evidencia de déficit en la memoria en los animales 3xTgAD de 6.5 meses de edad, por el contrario, los animales 3xTgAD parecen pasar más tiempo en la conducta denominada freezing que se refiere a que el animal está asustado por el estímulo que recibió, lo cuál se podría interpretar como que el animal tiene una mejor memoria o el estímulo genera mayor ansiedad en ellos que en los animales control (B6129SF2). También observaron que las hembras de ambas cepas pasan más tiempo en la conducta de freezing que los machos, lo cual podría indicar que los machos tienen un pequeño déficit cognitivo comparado con las hembras. En general las hembras presentan un mejor desempeño cognitivo que los machos a la edad de 6.5 meses, según lo reportado por estos autores. A pesar de que durante la adquisición no hubo diferencias, nuestros resultados coinciden con lo reportado por Stover y colaboradores quienes evaluaron el aprendizaje y la memoria espacial con el laberinto de Barnes en ratones 3xTgAD de 6 meses de edad y encontraron un peor desempeño en los machos comparados con las

hembras de la misma cepa. Ellos además observaron que a esta edad no existen diferencias en el desempeño conductual de machos y hembras 3xTgAD comparados con los ratones WT en la tarea de memoria de condicionamiento al miedo en contexto, lo cuál coincide con lo que observamos nosotros en el caso de las hembras 3xTgAD comparadas con las hembras WT en la tarea de Laberinto Acuático de Morris.

Además del trabajo de Stover, otros autores han reportado que en la prueba de alternancia espontánea de laberinto Y, el cuál se usa para medir memoria a corto plazo, las hembras 3xTgAD no tienen déficit a la edad de 6 meses, en otros trabajos reportan déficit desde los 6 meses de edad y algunos otros observan el déficit hasta los 7 meses de edad (Carrol *et al.*, 2007; Rosario *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2010). En otra tarea (reconocimiento de objeto novedoso) algunos estudios reportan déficit cognitivo en las hembras 3xTgAD de 6 meses de edad comparadas con ratones B6129SF2 (Chen *et al.*, 2013; Blanchard *et al.*, 2010). Sin embargo, otro estudio encuentra déficit cognitivo al probar a ratones hembra y machos 3xTgAD hasta los 9 meses de edad en ambas versiones, la de memoria a corto (1.5 horas después) y largo plazo (24 horas después) de la misma tarea de reconocimiento de objeto novedoso (Clinton *et al.*, 2007). Así mismo, Martínez-Coria y colaboradores encontraron que hay déficit cognitivo en ambas versiones (memoria de corto y largo plazo) en la tarea de reconocimiento de objeto novedoso en hembras y machos de 3xTgAD de 9 meses de edad comparados con ratones control de la misma edad (Martínez-Coria *et al.*, 2010).

En el laberinto radial los animales 3xTgAD presentaron déficit en la memoria de trabajo y de referencia comparados con sus controles (B6129SF2), estas diferencias se observaron desde los 2 meses de edad (Stevens y Brown, 2014). Algunos estudios han reportado también déficit cognitivo en este modelo en el condicionamiento contextual al miedo a los 6 meses de edad en ambos sexos (Billings *et al.*, 2005; España *et al.*, 2010). Por otro lado también existen estudios en los que no se han encontrado diferencias entre las cepas 3xTgAD y su control B6129SF2, o por sexo en la tarea conductual de condicionamiento contextual al miedo en animales de 13-14 meses de edad. Adicionalmente, Stevens y Brown encontraron que los machos 3xTgAD tienen peor desempeño en la memoria de trabajo y de referencia comparados con las hembras de la misma cepa, en el laberinto radial a los 2, 6 12 y 15 meses de edad (Stevens y Brown, 2014).

Por su parte, los reportes en memoria espacial también encuentran diferencias por sexo en los animales 3xTGAD. Un trabajo realizado por Blázquez y colaboradores reportó un peor desempeño en las hembras 3xTgAD comparadas con los machos de la misma cepa en el laberinto acuático de Morris a los 12 y 15 meses de edad (Blázquez *et al.*, 2014). Además, se ha sugerido que los parámetros de la tarea (Roof *et al.*, 1999), la cepa (Upchurch y Wehner, 1988; Adams *et al.*, 2002) , y el sexo de los ratones (Voikar *et al.*, 2001) puede influenciar el desempeño espacial en el laberinto acuático de Morris.

Machos y hembras usan diferentes estrategias o exhiben estrategias diferentes en el uso de claves espaciales para resolver laberintos; las hembras usan una estrategia de respuesta a claves mientras que los machos usan una estrategia de lugar (Yagi y Galea, 2019). En congruencia con estos resultados un metaanálisis de estudios de laberinto radial y laberinto acuático de Morris demostró que las hembras de ratón tienen una ligera ventaja en el laberinto acuático de Morris mientras que los machos muestran una ligera ventaja en el laberinto radial (Jonasson, 2005). Existe otro estudio en el que se demuestra que ratones hembras envejecidas se desempeñan mejor en aprendizaje espacial que los machos (Frick *et al.*, 2000). Además de este estudio en ratones, también en ratas se ha demostrado que las hembras se desempeñan mejor en la tarea de memoria de localización de objeto, la cual también depende de hipocampo (Saucier *et al.*, 2008). Hay mucha evidencia acerca de las diferencias por sexo en las estrategias de aprendizaje (Grissom *et al.*, 2013; Galea y Kimura, 1993; Cherney *et al.*, 2008) que sugieren que machos y hembras emplean diferentes regiones cerebrales durante las tareas de memoria espacial lo que contribuye a diferencias en el desempeño conductual durante la navegación espacial (Yagi y Galea, 2019).

Las diferencias por sexo han sido reportadas además de los modelos murinos, en varios mamíferos y en humanos y no sólo en el desempeño cognitivo sino también en la respuesta inmune y la mortalidad. Existe evidencia de que con la edad se produce un declive en los sistemas regulatorios, principalmente el nervioso, el endócrino y el inmune, es decir en la red neuroinmunoendocrina (Fabris, 1990; Bellinger *et al.*, 2001; De la Fuente *et al.*, 2005). Con la edad los tipos y los niveles de citocinas que están en contacto con las células nerviosas y endócrinas cambian; las citocinas inflamatorias y los compuestos oxidantes incrementan (De la Fuente *et al.*, 2005). Todos estos cambios pueden modificar la función nerviosa (Merril, 2001). Con relación

a las diferencias entre sexo en los cambios relacionados con la red neuroinmunoendócrina durante el envejecimiento, se ha demostrado que las hembras viven más tiempo que los machos en un gran rango de especies animales, incluyendo los humanos. Muchos factores pueden influir en esta longevidad dependiente del sexo, dentro de estos factores se encuentran los relacionados con el comportamiento y las diferencias fisiológicas (estrógenos, niveles de cortisol/corticosterona) (Kraemer, 2000; Owens, 2002).

En cuanto al sistema inmune, se ha reportado que en las hembras funciona de manera más eficiente y efectiva por más tiempo que en los machos (Aspinall, 2000). Las hembras presentan anticuerpos más fuertes (Weinstein *et al.*, 1984) y respuesta inmune más fuerte (De la Fuente *et al.*, 2004) que los machos y se ha sugerido que los estrógenos son los responsables de estas diferencias (De la Fuente *et al.*, 2004; Keller *et al.*, 2001). El efecto que los estrógenos podrían tener sobre el sistema inmune puede estar relacionado con la sobreexpresión de enzimas antioxidantes, lo cual tiene como resultado un incremento en los niveles de glutathione reducido (Borrás *et al.*, 2007), lo que puede preservar la función inmune a lo largo del proceso de envejecimiento (De la Fuente *et al.*, 2005; Guayerbas *et al.*, 2004; De la Fuente, 2004; De la Fuente *et al.*, 2004).

En esta misma línea, se ha reportado que los machos de la cepa 3xTg-AD tienen una disfunción del sistema inmune y una alta mortalidad comparado con las hembras de la misma cepa (Giménez-Llort *et al.*, 2008). La inflamación ha sido asociada a la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer; la producción de citocinas pro-inflamatorias puede perpetuar el ciclo de procesos neuroinflamatorios incluyendo la amiloidosis, la muerte neuronal, la reducción del volumen cerebral y los eventos relacionados con enfermedades cerebrovasculares y neurodegeneración (McGrattan *et al.*, 2019).

En el presente trabajo la cepa control no mostró deterioro cognitivo con la edad o alguna mejora de la memoria al recibir el tratamiento con citrulina. En contraste, otros experimentos preliminares que han sido realizados en esta cepa, animales C57BL6J de 24 meses de edad que recibieron la misma dosis de citrulina durante tres meses, mejoraron su memoria en el laberinto Y (Marquet-de Rouge *et al.*, 2013). A diferencia de este trabajo nuestro grupo más viejo (12 meses) tenía la mitad de edad de estos animales, por lo cual es probable que nuestro grupo aún no presentara algún deterioro cognitivo en la memoria espacial a largo

plazo y por tal motivo no pudimos observar algún efecto con el tratamiento de citrulina sobre el deterioro cognitivo en los animales WT; esto aunado a la variabilidad que observamos en el modelo y al número de ratones por grupo.

En cuanto a la progresión de la Enfermedad de Alzheimer en el ratón transgénico, el mismo tratamiento administrado al grupo de 9 meses de edad sólo provocó una tendencia a la mejora de la memoria a largo plazo en los machos 3xTgAD. Al respecto, ha sido reportado que durante la progresión de la EA el déficit cognitivo aumenta y la posibilidad de revertir los síntomas se ven reducidos, lo que coincide con nuestros resultados. La administración con citrulina reduce el deterioro de la memoria sólo cuando es realizada en una etapa temprana de la enfermedad en este modelo murino. Respecto a las hembras los resultados obtenidos en el grupo de 12 meses de edad en el laberinto acuático de Morris, no reflejan el efecto del tratamiento con citrulina debido a que las hembras no presentaron déficit cognitivo a esta edad; el número de animales por grupos (cuatro) de esta edad también es un factor a considerar para la interpretación de los datos obtenidos, el aumento en el número de animales por grupo de edad (12 meses) podría permitir la obtención de resultados más concluyentes.

Dado que la administración de citrulina tuvo un efecto benéfico sobre el desempeño de los animales en una tarea espacial, evaluamos las implicaciones biológicas que el aminoácido citrulina podría tener. El metabolismo de citrulina en mamíferos puede ser clasificado dentro de tres vías: la biosíntesis de arginina, el ciclo del óxido nítrico el cual se ha demostrado está implicado en cognición y aprendizaje (Curis *et al.*, 2005), y el ciclo de la urea, el cual tiene lugar en el hígado (Hawkins, 1996). Por ello, decidimos evaluar los cambios en los niveles de arginina y óxido nítrico, como una posible vía mediante la cual podría generarse el efecto sobre la memoria a largo plazo. Encontramos que los niveles de arginina incrementan en el líquido cefalorraquídeo después de la administración de citrulina, esto fue observado en ambas cepas y en ambos sexos. Sin embargo, sólo pudimos analizar un pull de 4 muestras de líquido cefalorraquídeo proveniente de 4 animales de la misma cepa con el mismo tratamiento; por lo cual no se pudo realizar ningún análisis estadístico, lo que constituye una limitante en nuestro estudio. Además de estos cambios en líquido

cefalorraquídeo, encontramos una tendencia al incremento en los niveles de arginina en hipocampo de machos 3xTgAD, en los que se observó la mejora conductual.

Una manera de interpretar estos resultados es a través del metabolismo de arginina, la cual puede provenir de tres fuentes distintas: arginina extracelular, la síntesis de novo de arginina y arginina liberada tras la degradación celular de proteínas. Ha sido demostrado que dentro de las células existen reservorios de arginina, en los cuales la cantidad de arginina puede variar de acuerdo al intercambio de la misma entre los diferentes compartimentos celulares (Morris, 2016) y también con respecto al intercambio con el espacio extracelular vía transportadores, así como la accesibilidad que tenga la NOS a estos reservorios de arginina. Respecto a esto, se ha reportado que la suplementación con L-arginina afecta la actividad de las NOS, a pesar de que la concentración intracelular de arginina es casi de 100 micromoles por litro, lo cual excede por mucho la K_m de la eNOS que es de aproximadamente 5 micromoles, aún así la arginina extracelular intensifica la producción de NO (Dioguardi 2011). Ha sido reportado que la óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS) de células de neuroepitelioma y neuroblastoma pueden ser nutridas rápida y eficientemente mediante arginina extracelular y que la síntesis de óxido nítrico es recuperada completamente 4 horas después de la adición de arginina extracelular (Simon *et al.*, 2013). Además, Tachikawa y colaboradores han reportado que en machos de rata Wistar de 21 días de edad L-arginina es transportada intacta dentro del cerebro y metabolizada inmediatamente ya sea a óxido nítrico o a poliaminas, dependiendo de los requerimientos (Tachikawa *et al.*, 2018). Lo anterior podría contribuir a la explicación del por qué no detectamos cambios significativos en los niveles de arginina en tejido hipocampal de los ratones 3xTgAD administrados con citrulina; los reservorios de arginina pueden permanecer intactos debido a que los requerimientos de arginina en las diferentes vías son cubiertos por arginina extracelular, la cual se ha visto que es empleada antes que arginina que se encuentra dentro de los reservorios celulares; a este fenómeno se le conoce como la paradoja de arginina. En concordancia con este trabajo ha sido demostrado que pacientes geriátricos (de entre 79-86 años de edad) con enfermedad cerebrovascular tratados con L-arginina oral en una dosis de 1.6 g por día durante 3 meses mejoran su función cognitiva (medida mediante la escala de Demencia Hasegawa y muestran una reducción de los niveles de peroxidación de lípidos. Sin embargo, las

mismas mediciones se realizaron en estos pacientes tres meses después de terminar el tratamiento con arginina y los niveles de peroxidación de lípidos incrementaron y los niveles en la escala de Demencia de Hasegawa regresaron a los niveles reportados antes de la administración de arginina (Ohtsuka y Nakaya, 2000). Además de este trabajo, también ha sido reportado que la inyección intracerebroventricular de L-arginina durante 28 días, mejora la adquisición de la memoria espacial en hembras 3xTgAD de 6.5 meses de edad en el laberinto acuático de Morris, adicionalmente observaron un incremento de la latencia en el cuadrante correcto y demostraron además que los animales inyectados con arginina mostraron mejor memoria espacial de trabajo en el laberinto en Y (Fonar *et al.*, 2018).

Finalmente realizamos la determinación de los niveles de óxido nítrico como un producto de arginina pero no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los animales 3xTgAD administrados con citrulina y los animales de la misma cepa que recibieron agua. Sin embargo, se puede observar gráficamente una tendencia al incremento en el nivel de óxido nítrico en los animales 3xTgAD que recibieron citrulina. Respecto a esto, se ha demostrado que los sistemas regulatorios del ON son complejos, en parte debido a que las concentraciones de NO tienen muchas variaciones en magnitud, es decir, las concentraciones fisiológicas pueden variar (en un rango bajo) desde nanomoles hasta micromoles. Bajas concentraciones de NO pueden estimular vías que son altamente reactivas al NO (Thomas *et al.*, 2015), por ejemplo, la vía de NO-cGMP/proteína cinasa G, la cual puede modificar otra importante vía de señalización como la de las MAP cinasas, permitiendo la transcripción de ERK el cual tiene una variedad de efectos sobre la plasticidad sináptica (Batchelor *et al.*, 2010; Ota *et al.*, 2010), que a su vez está relacionada con la formación de la memoria (Chien *et al.*, 2003).

Por ello, a pesar de que no encontramos diferencias estadísticamente significativas en los niveles de NO, los pequeños cambios que observamos pueden tener un impacto biológico importante que pudiera reflejarse en la mejora de la memoria. Al respecto, se ha demostrado que la actividad de nNOS y eNOS tiene como resultado bajos niveles de NO que son asociados con la regulación fisiológica de la neurotransmisión, el tono vascular y posible participación en vías anti-apoptóticas y de sobrevivencia en situaciones donde neurotoxinas u otros daños al cerebro se presenten (Martínez-Ruiz *et al.*, 2011). En las células de mamíferos

el blanco molecular del NO es la proteína guanilil ciclasa soluble (sGC) que cataliza la conversión de GTP a cGMP un segundo mensajero relevante que participa en el desencadenamiento de la reacción postsináptica a un transmisor (Garthwaite, 2008; Krumenacker *et al.*, 2004). Este posible efecto del NO ha sido también sugerido en pacientes en los que se ha administrado arginina y se ha visto un efecto positivo sobre el déficit cognitivo, a pesar de que no se midieron los niveles de óxido nítrico en este trabajo, los autores sugieren que el incremento en los niveles de NO como neurotransmisor o el incremento en el flujo de sangre cerebral mediante el incremento de NO podrían tener beneficios sobre la función cognitiva (Ohtsuka y Nakaya, 2000). Otro factor que pudo influenciar la medición de NO, es el tiempo transcurrido entre la última administración de citrulina y el tiempo en el que se sacrificó a los animales y se hicieron las mediciones correspondientes que fue de 8 a 10 días. Se ha reportado que la administración de arginina extracelular induce un incremento en los niveles de NO 4 horas después de su adición (Simon *et al.*, 2013). Además se ha reportado que los cambios en niveles de NO pueden ser visibles de una manera más exacta en microvasos y no en tejido cerebral, esto fue reportado en un modelo murino deficiente de la eNOS del cual se extrajeron los microvasos y el hemisferio completo para hacer esta medición de NO y pudieron observar cambios en niveles de NO sólo en los microvasos pero no en el tejido cerebral de estos animales (Austin *et al.*, 2010). Aunado a esto, en este trabajo se realizó la medición de metabolitos secundarios del NO, (nitratos y nitritos) que es un método indirecto.

En cuanto a las diferencias por cepa de los animales encontramos que, tanto en hembras como en machos, los animales 3xTgAD tuvieron niveles más elevados de NO con respecto a los WT. Estos resultados coinciden con lo reportado por Dias y colaboradores observaron que los ratones jóvenes 3xTgAD (3 y 6 meses de edad) presentaban un aumento en la señal del pico de NO que tendía a ser mayor que sus controles de la misma edad y este pico iba decayendo con la edad mientras que la amplitud de la señal del pico de NO incrementaba en los ratones 3xTgAD durante la progresión de la enfermedad (12 y 18 meses de edad). En este trabajo proponen que este aumento en la producción de NO en etapas tempranas puede ser un mecanismo de compensación para la depresión sináptica asociada a la enfermedad de Alzheimer (Dias *et al.*, 2016).

Además, encontramos un incremento en los niveles de NO en las hembras 3xTgAD comparadas con los machos de la misma cepa y edad. En este sentido se ha demostrado que las hormonas tienen influencia sobre la función endotelial a través de los agonistas y esto contribuye a que existan diferencias en la función endotelial y el riesgo de enfermedad cardiovascular entre machos y hembras (Stanhewicz *et al.*, 2018), así como en la progresión y manifestación de desórdenes cognitivos (Galea *et al.*, 2017). Por otra parte, se ha demostrado que los estrógenos pueden unirse a la eNOS y de esta manera promueven la producción de NO en la caveola endotelial (Mineo y Shaul, 2012) lo cual podría tener un efecto sobre la cognición.

Nuestros resultados sugieren una mejora en la memoria a largo plazo observada en los animales 3xTgAD de 8 meses de edad que recibieron la administración de citrulina, nosotros propusimos la vía de las NOS y la producción de NO como posible vía por la cual se podría explicar esta mejora, ya que ha sido bien documentado que la administración de citrulina, un precursor de arginina, aumenta los niveles de arginina sistémicos. También ha sido informado que el aumento en niveles de arginina puede incrementar los niveles de producción de NO. Sin embargo, nuestros resultados no permiten asegurar que esta sea la vía mediante la cual se obtiene esta mejora en la memoria a largo plazo, a pesar de haber visto un incremento en los niveles de arginina en líquido cefalorraquídeo de los animales 3xTgAD administrados con citrulina.

Es importante tomar en cuenta que existen otros mecanismos que no han sido analizados en este trabajo que podrían tener influencia sobre la mejora en la memoria que observamos en el grupo joven de machos 3xTgAD. Respecto a esto, se ha reportado que citrulina tiene un efecto sobre la toxicidad inducida por estrés oxidativo; esto fue observado en ratas envejecidas en las cuales citrulina tuvo un efecto positivo sobre la recuperación del LTP en el hipocampo de estas ratas que mostraron daño oxidativo asociado a la edad (Ginguay *et al.*, 2019). También se ha demostrado que la suplementación con citrulina oral tiene un efecto protector contra la carbonilación de proteínas cerebrales (Moinard *et al.*, 2007). En otro trabajo se reportó que tres meses de suplementación con citrulina oral reducen la oxidación de lipoproteínas en suero de ratas envejecidas (Moinard *et al.*, 2015).

Además, se demostró que la suplementación con citrulina durante 3 meses reduce los cambios relacionados con la edad en balsas lipídicas del hipocampo y todas las ratas tratadas con citrulina mostraron niveles bajos

de precursor de proteína amiloide (APP), niveles bajos del fragmento C99-APP-Cter, este fragmento es el primer paso de APP en la ruta amiloidogénica y reducción de los niveles de la proteína caveolina 1, que es una proteína de membrana que posee un dominio de andamiaje de interacción con la nNOS, lo que resulta en una inhibición de la formación de NO, al reducir los niveles de CAV-1 se evita la inhibición de la nNOS y se permite la producción de NO (Marquet-de Rougé *et al.*, 2013). En otro trabajo en el que se suplementó al modelo 3xTgAD con arginina de manera intracerebroventricular se observó una mejora en la adquisición y memoria a corto y largo plazo en tareas de memoria espacial, Laberinto Acuático de Morris y laberinto en Y, sin embargo no se observaron cambios en los niveles de placas neuríticas formadas por el péptido beta amiloide, al respecto los autores sugieren que el efecto positivo de la inyección de arginina sobre el déficit cognitivo asociado a la enfermedad de Alzheimer en este modelo animal, no está relacionado con la reducción de la formación de placas de beta amiloide; a pesar de que ha sido reportado en otros trabajos que la pérdida de NO proveniente de la eNOS contribuye al procesamiento amiloidogénico de APP y el déficit cognitivo (Austin *et al.*, 2013), o la facilitación de neuroplasticidad (LTP), más bien sugieren una mejora dependiente de la protección contra daño oxidativo y muerte celular por parte de arginina (Fonar *et al.*, 2018). Estas propiedades de protección contra daño oxidativo y muerte celular también han sido reportadas para el aminoácido citrulina. Todos estos fenómenos se han reportado en la enfermedad de Alzheimer, por lo que es posible que citrulina actúe sobre algunas de estas vías de forma independiente de la producción de óxido nítrico.

11. CONCLUSIONES

Sabemos que la arginina juega un papel relevante en la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer debido a su participación en procesos tanto fisiológicos como patológicos (metabolismo celular redox, inflamación, regulación del flujo cerebral, neuroplasticidad). Dado que ha sido reportado que la administración de citrulina aumenta los niveles de arginina en plasma a largo plazo de manera más eficiente que la arginina, en este trabajo se administró citrulina al grupo experimental. Nuestros resultados muestran que la citrulina, un suplemento no tóxico que ha sido previamente usado para otros padecimientos en humanos, mejora la memoria espacial a largo plazo en machos del modelo murino 3xTgAD en etapas tempranas de la enfermedad. Sin embargo, en etapas tardías, no mostró mejora de la memoria en esta tarea. En cuanto a la vía mediante la cual la citrulina pudo influir en la mejora de la memoria a largo plazo en este modelo murino, nuestros resultados muestran un aumento en los niveles de arginina en líquido cefalorraquídeo en los animales 3xTgAD que recibieron citrulina así como un pequeño aumento en los niveles de arginina y óxido nítrico en el hipocampo de los animales suplementados con citrulina.

De acuerdo a estos resultados consideramos que la suplementación con citrulina es un buen candidato para elevar los niveles de arginina en enfermedades en las que haya un déficit de la misma, en el caso de la EA aún queda mucho por investigar acerca del papel de la arginina en la progresión de la enfermedad, sin embargo existen reportes que indican un decremento en niveles de este aminoácido que ha sido relacionado con el deterioro cognitivo observado en la misma. Se ha sugerido que esto se debe a una disminución en la producción de óxido nítrico que se sabe participa en procesos de aprendizaje y memoria. Además de incrementar los niveles de arginina, la citrulina ha demostrado propiedades antioxidantes; en nuestro trabajo quisimos probar las propiedades antioxidantes de la citrulina como atrapador del radical hidroxilo; sin embargo, no obtuvimos diferencias significativas entre los grupos de animales 3xTgAD administrados con citrulina y los controles. Lo que sí corroboramos es que los animales transgénicos tienen un aumento en la producción de radical hidróxilo; lo cual se podría traducir en un aumento en el riesgo de presentar estrés oxidativo, algo que ya habíamos reportado en estos ratones anteriormente.

Se ha demostrado que la citrulina tiene efectos positivos sobre algunos marcadores involucrados en la progresión de la Enfermedad de Alzheimer tales como la disminución de proteína APP, fragmento C99-APP-Cter, CAV1 y colesterol, un aumento de óxido nítrico y actividad de enzimas eNOS y nNOS, la disminución de estrés oxidativo mediante la reducción de radical OH, potenciación de LTP en envejecimiento y reducción de procesos inflamatorios y carbonilación de proteínas. Dado que no realizamos una prueba que pueda eliminar estos efectos de la citrulina, cualquiera de estos mecanismos o procesos podrían estar contribuyendo en mayor o menor medida en los resultados obtenidos en el presente trabajo.

Por lo anterior, la citrulina, un precursor de la arginina podría ser considerada un adyuvante para mejorar la memoria en las etapas tempranas de la enfermedad de Alzheimer, probablemente mediante el incremento de óxido nítrico. Sin embargo, todavía hay mucho trabajo por realizar para revelar el potencial completo de la citrulina y los mecanismos de acción precisos que podrían beneficiar el desarrollo de la Enfermedad de Alzheimer.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Akashi, Miyake, & Yokota. Citrulline, a novel compatible solute in drought-tolerant wild watermelon leaves, is an efficient hydroxyl radical scavenger. (2001). *FEBS Lett.* 508, 438–442
2. Arancio, Kiebler, Lee, Lev-Ram, Tsien, et al. Nitric oxide acts directly in the presynaptic neuron to produce long-term potentiation in cultured hippocampal neurons. (1996). *Cell* 87: 1025–1035.
3. Arlt, Schwedhelm, Kölsch, Jahn, Linnebank, Smulders, et al. Dimethylarginines, homocysteine metabolism, and cerebrospinal fluid markers for Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2012;31:751–8.
4. Arlt, Schwedhelm, Kölsch, Jahn, Linnebank, Smulders, Jessen, Böger, Popp. Dimethylarginines, Homocysteine Metabolism, and Cerebrospinal Fluid Markers for Alzheimer's Disease. (2012). *Journal of Alzheimer's Disease.* 31: 751-758.
5. Aspinall R. Longevity and the immune response. *Biogerontology.* (2000). 1:273–278.
6. Austin, Santhanam, Katusic. Endothelial nitric oxide modulates expression and processing of amyloid precursor protein. (2010). *Circ Res*;107:1498–502.
7. Austin, Santhanam, Hinton, et al. Endothelial nitric oxide deficiency promotes Alzheimer's disease pathology. (2013). *J Neurochem.* 127: 691-700.
8. Adams, Fitch, Chaney, Gerlai. Altered performance characteristics in cognitive tasks: comparison of the albino ICR and CD1 mouse strains. (2002) *Behav. Brain res.* 133: 351-361.
9. Bahri, Zerrouk, Aussel, et al. Citrulline: From metabolism to therapeutic use. (2012) *Nutrition.*
10. Baldacci, Lista, Cavedo, Bonuccelli, Hampel. Diagnostic function of the neuroinflammatory biomarker YKL-40 in Alzheimer's disease and other neurodegenerative diseases. (2017). *Expert Rev Proteomics.* 14:285–299.
11. Baldacci, Toschi, Lista, Zetterberg, Blennow, Kilimann, Teipel, Cavedo, dos Santos, Epelbaum, Lamari, Dubois, Floris, Garaci, Bonuccelli, Hampel. Two-level diagnostic classification using cerebrospinal fluid YKL-40 in Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia.* (2017). 13:993–1003.
12. Bansal, Rodriguez, Wu, Eichler, Zabaletta, Taheri, Ochoa. Citrulline can preserve proliferation and prevent the loss of CD3 β chain under conditions of low arginine. (2004). *J Parenter Enteral Nutr* 28: 423–430.
13. Barr, Tirona, Taylor, et al. Pharmacokinetics and safety of intravenously administered citrulline in children undergoing congenital heart surgery: Potential therapy for postoperative pulmonary hypertension. (2007). *J Thorac Cardiovasc Surg.* 134:319-26
14. Barkhidarian, Seyedhamzeh, Hashemy, Nematy, Rahbari, Ranjbar, Safarian. Effects of arginine and citrulline supplementation on inflammatory markers in critically ill patients. (2016) *J. Nutr. Sci. Diet.* 2.
15. Batchelor, Bartus, Reynell, Constantinou, Halvey, Held, et al. Exquisite sensitivity to subsecond, picomolar nitric oxide transients conferred on cells by guanylyl cyclase-coupled receptors. (2010). *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 107:22060–5.
16. Baum LW. Sex, hormones and Alzheimer's disease. (2005). *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 60 (6): 736-43.
17. Baur, Stalon, Falmagne, Luethi, Haas. Primary and quaternary structure of the catabolic ornithine carbamoyltransferase from *Pseudomonas aeruginosa*. Extensive sequence homology with the anabolic ornithine carbamoyltransferases of *Escherichia coli*. (1987). *Eur J Biochem* 166: 111–117.
18. Billings, Oddo, Green, et al. Intraneuronal A β Causes the Onset of Early Alzheimer's Disease-Related Cognitive Deficits in Transgenic Mice. (2005). *Neuron.* 45; 675–688.
19. Blanchard, Wanka, Tung, Cárdenas-Aguayo, LaFerla, Iqbal, et al. Pharmacologic reversal of

- neurogenic and neuroplastic abnormalities and cognitive impairments without affecting A β and tau pathologies in 3xTg-AD mice. (2010). *Acta Neuropathol.*120:605–21.
20. Blázquez, Carñete, Toberña, Giménez-Llort, Fernández-Teruel. Cognitive and emotional profiles of aged Alzheimer’s disease (3xTg-AD) mice: effects of environmental enrichment and sexual dimorphism. (2014). *Behav Brain Res.* 268:185–201.
 21. Bon y Garthwaite. On the role of nitric oxide in hippocampal long term potentiation. (2003). *J Neurosci* 23: 1941-1948.
 22. Bourasset, Ouellet, Tremblay, Julien, Do, Oddo, *et al.* Reduction of the cerebrovascular volume in a transgenic mouse model of Alzheimer’s disease. (2009). *Neuropharmacology* 56:808–13.
 23. Borrás, Gambini, Viña. Mitochondrial oxidant generation is involved in determining why females live longer than males. (2007). *Front Biosci.* 12:1008–1013
 24. Braissant, Gotoh, Loup, Mori, Bachmann. L-Arginine Uptake, the Citrulline-NO Cycle and Arginase II in the Rat Brain: An in Situ Hybridization Study. (1999). *Molecular Brain Research.* 70: 231-241.
 25. Brandeis, Brandys, Yehuda. The Use of the Morris Water Maze in the Study of Memory and Learning. (1989). *International Journal of Neuroscience.* 48; 29-69.
 26. Cai, Cong, Ji, Rothman, Maudsley, Martin. Metabolic Dysfunction in Alzheimers Disease and Related Neurodegenerative Disorders. (2012). *Current Alzheimer Research* 9:5–17.
 27. Canteros M.G. D-Arginine as a neuroprotective amino acid: promising outcomes for neurological diseases (2014). 19(5):627-636.
 28. Carroll, Rosario, Chang, Stanczyk, Oddo, LaFerla, *et al.* Progesterone and estrogen regulate Alzheimer-like neuropathology in female 3xTg-AD mice. (2007). *J Neurosci.* 27:13357–65.
 29. Chen, Liang, Blanchard, Dai, Sun, Lee, *et al.* A Non-transgenic mouse model (icv-STZ mouse) of Alzheimer’s disease: similarities to and differences from the transgenic model (3xTg-AD mouse). (2013). *Mol Neurobiol.* 47:711–25.
 30. Cherney, Brabec, Runco. Mapping out spatial ability: sex differences in way-finding navigation. (2008). *Percept. Mot. Skills.* 107; 747-760.
 31. Chien, Liang, Teng, Kuo, Lee, Fu. Enhancement of long-term potentiation by a potent nitric oxide-guanylyl cyclase activator, 3-(5-hydroxymethyl-2-furyl)-1-benzyl-indazole. (2003). *Mol Pharmacol.* 63:1322–8.
 32. Christopherson, Bredt. Nitric oxide in excitable tissues: physiological roles and disease. (1997). *J Clin Invest.* 100:2424–9.
 33. Chow C., Epp JR., Lieblich SE., Barha CK., Galea LA. Sex differences in neurogenesis and activation of new neurons in response to spatial learning and memory. (2013). *Psychoneuroendocrinology.* 38: 1236-50.
 34. Ibáñez, Simó, Martín-Álvarez *et al.*, “Toward a predictive model of Alzheimer’s disease progression using capillary electrophoresis-mass spectrometry metabolomics,”. (2012). *Analytical Chemistry*, vol. 84, no. 20, pp. 8532–8540.
 35. Citrulline: From metabolism to therapeutic use. (2013). *Nutrition.* 29:479–84.
 36. Clinton, Billings, Green, Caccamo, Ngo, Oddo, *et al.* Age-dependent sexual dimorphism in cognition and stress response in the 3xTg-AD mice. (2007). *Neurobiol Dis.* 28:76–82.
 37. Clinton, Blurton-Jones, Myczek, Trojanowski, LaFerla. Synergistic interactions between Abeta, tau, and alpha-synuclein: acceleration of neuropathology and cognitive decline. (2010). *J Neurosci.* 30:7281–9
 38. Coles, K.E. An Investigation into the Antioxidant Capacity of L-Arginine and L-Citrulline in Relation to Their Vascular Protective Properties. (2007). Ph.D. Dissertation, Cardiff University, Ann Arbor, MI, USA.
 39. Collins, Wu, Perkins, *et al.* Watermelon consumption increases plasma arginine concentrations in adults. (2007). *Nutrition.* 23:261–6.
 40. Curis, Nicolis, Moinard, Osowska, Zerrouk, Bénazeth & Cynober. Almost all about citrulline in mammals. (2005) In *Amino Acids* (Vol. 29, Issue 3, pp. 177–205).
 41. Cynober L. Plasma amino acid levels with a note on membrane transport: characteristics,

- regulation, and metabolic significance. (2002). *Nutrition* 18: 761–766
42. Cynober, Le Boucher, Vasson. Arginine metabolism in mammals. (1995). *J Nutr Biochem* 6: 402–413
 43. De la Fuente, Medina. NPY and phagocytic cell functions; in Zukowska Z, Feuerstein GZ (eds): *The NPY Family of Peptides in Immune Disorders, Inflammation, Angiogenesis and Cancer*. (2005). Basel, Birkhäuser Verlag. pp 107–122.
 44. De la Fuente, Hernanz, Vallejo. The immune system in the oxidation stress conditions of aging and hypertension: favorable effects of antioxidants and physical exercise. (2005). *Antioxid Redox Signal*. 7:1356–1366.
 45. De la Fuente M: The immune system as a 56 marker of health and longevity. (2004) *Antiaging Medicine*. 1:31–41.
 46. De la Fuente, Baeza, Guayerbas, Puerto, Castillo, Salazar, Ariznavarreta, Tresguerres. Changes with aging in several leukocyte functions of male and female rats. (2004). *Biogerontology*. 5:389–400.
 47. De la Fuente, Hernanz, Guayerbas, Puerto, Alvarez, Alvarado. Changes 57 with age in peritoneal macrophage functions. Implication of leukocytes in the oxidative stress of senescence. (2004b). *Cell Mol Biol*. 50:OL683–OL690.
 48. De la Monte, Tong. Brain metabolic dysfunction at the core of Alzheimer’s disease. (2014). *Biochem Pharmacol*. 88:548–59.
 49. Demetrius, Magistretti & Pellerin. Alzheimer’s disease: the amyloid hypothesis and the Inverse Warburg effect. (2014). *Front Physiol* 5, 522.
 50. D’Hooge, De Deyn. Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. (2001). *Brain Research Reviews*. 36; 60-90.
 51. Dias, Lourenço, Ferreira, Barbosa, Laranjinha, Ledo. Age-dependent changes in the glutamate-nitric oxide pathway in the hippocampus of the triple transgenic model of Alzheimer’s disease: implications for neurometabolic regulation. (2016). *Neurobiology of Aging*. 06. 012.
 52. DiGuardi, Francesco Saverio. “To Give or Not to Give? Lessons from the Arginine Paradox”. (2011). *Journal of Nutrigenetics and Nutrigenomics*.
 53. Domek-Łopacinska, Strosznajder. Cyclic GMP and nitric oxide synthase in aging and Alzheimer’s disease. (2010). *Mol. Neurobiol*. 41, 129-137
 54. Doreulee, Sergeeva, Yanovsky, Chepkova, Selbach, Godecke, Schrader, Haas. Corticostriatal synaptic plasticity in endothelial nitric oxide synthase deficient mice. (2003) *Brain Res*. 964:159–163.
 55. Dubey, Gulati, Ray. Amelioration by nitric oxide (NO) mimetics on neurobehavioral and biochemical changes in experimental model of Alzheimer’s disease in rats. (2018). *Neurotoxicology*. 66:58–65.
 56. Duchemann, Osowska, Walrand, Paillard, Boirie, Cynober, Moinard. La Citrulline améliore l’accumulation protéique musculaire chez le rat âgé dénutri via une stimulation de la synthèse protéique. (2004). *Nut Clin Metabol* 18: S20.
 57. Grissom, Hawley, Hodges. Fawcett-Pattel, Dohanich. Biological sex influences learning strategy preference and muscarinic receptor binding in specific brain regions of prepubertal rats. (2013) *Hippocampus*. 23; 313-322.
 58. España, Giménez-Llort, Valero, Miñano, Rábano, Rodríguez-Alvarez, *et al*. Intraneuronal beta-amyloid accumulation in the amygdala enhances fear and anxiety in Alzheimer’s disease transgenic mice. (2010) *Biol Psychiatry*. 67:513–21.
 59. Fabris N: A neuroendocrine-immune theory of aging. (1990) *Int J Neurosci*. 51:373–375. Bellinger, Madden, Lorton, Thyagarajan, Felten. Age-related alterations in neural-immune interactions and neural strategies in immunosenescence; in Ader, Felten, Cohen (eds). (2001). *Psychoneuroimmunology*. San Diego, Academic Press. pp 241–286.
 60. Feldman, Griffith, Stuehr. The surprising life of nitric oxide. (1993). *Chem Eng News*. 71: 26-39.
 61. Ferrer I. Altered mitochondria, energy metabolism, voltage-dependent anion channel, and

- lipid rafts converge to exhaust neurons in Alzheimer's disease. (2009). *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 41:425–31.
62. Ferri, Prince, Brayne, Brodaty, Fratiglioni, Ganguli, Hall, Hasegawa, Hendrie, Huang, Jorm, Mathers, Menezes, Rimmer, Scazufca y Alzheimer Disease International. Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. (2005). *Lancet*. 366(9503); 2112-2117.
 63. Figueroa, Sanchez-Gonzalez, Wong, Arjmandi. Watermelon extract supplementation reduces ankle blood pressure and carotid augmentation index in obese adults with prehypertension or hypertension. (2012). *Am. J. Hypertens*. 25, 640–643.
 64. Fonar, Polis, Meirson, Maltsev, Elliott, Samson. Intracerebroventricular administration of L-Arginine improves spatial memory acquisition in triple transgenic mice via reduction of oxidative stress and apoptosis. 2018. *Translational Neuroscience*. 9: 43-53.
 65. Fonteh, Harrington, Tsai, Liao, Harrington. Free amino acid and dipeptide changes in the body fluids from Alzheimer's disease subjects. (2007). *Amino Acids*. 32:213–24
 66. Franceschi, Bonafe, Valensin, Olivieri, De Luca, Ottaviani, De Benedictis. Inflammaging. An evolutionary perspective on immunosenescence. (2000). *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 908, 244–254.
 67. Frick, Burlingame, Arters, Berger-Sweeney. Reference memory, anxiety and estrous cyclicity in C57BL/6NIA mice are affected by age and sex. 2000. *J. Neuroscience*. 95: 293-307.
 68. Gallagher, Burwell, Burchinal. Severity of spatial learning impairment in aging: Development of a learning index for performance in the Morris water maze (2015). *Behav, Neurosci*. 129; 540-548.
 69. Galea, Frick, Hampson, Sohrabji, Choleris. Why estrogens matter for behavior and brain health. (2017). *Neurosci Biobehav Rev*. 363-379.
 70. Garthwaite, J. Concepts of neural nitric oxide-mediated transmission. (2008). *The European journal of neuroscience* 27(11), 2783-802.
 71. Gaston, Reilly, Drazen, Fackler, Ramdev, Arnette, *et al.* Endogenous nitrogen oxides and bronchodilator S-nitrosothiols in human airways. (1993). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90: 10957-61.
 72. Giménez-Llort, Arranz, Maté, De la Fuente. Gender-specific neuroimmunoendocrine aging in a triple-transgenic 3xTg-AD mouse model for Alzheimer's disease and its relation with longevity. (2008). *Neuroimmunomodulation*. 15:331–43
 73. Graham, Chevallier, Elliott, *et al.*, "Untargeted metabolomic analysis of human plasma indicates differentially affected polyamine and L-Arginine metabolism in mild cognitive impairment subjects converting to Alzheimer's disease,". (2015). *PLoS ONE*, vol. 10, no. 3.
 74. Griffin, Bradshaw. Amino Acid Catabolism in Alzheimer's Disease Brain: Friend of Foe? (2017). *Hindawi Oxidative Medicine and Cellular Longevity*.
 75. Guayerbas, Puerto, Alvarez, De la Fuente. Improvement of the macrophage functions in premature ageing mice by a diet supplemented with thiolic antioxidants. (2004). *Cell Mol Biol*. 50:OL677–OL681.
 76. Gueli, Taibi. Alzheimer's disease: amino acid levels and brain metabolic status. (2013). *Neurol Sci*.S10072-013-1289-9
 77. Halliwell y Whiteman. Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?. (2004). *British Journal of Pharmacology*. 142, 231-255.
 78. Hartman, Torre, Prior. Dietary citrulline but not ornithine counteracts dietary arginine deficiency in rats by increasing splanchnic release of citrulline. (1994). *J Nutr* 124: 1950–1960.
 79. Haul, Godecke, Schrader, Haas, Luhmann. Impairment of neocortical long-term potentiation in mice deficient of endothelial nitric oxide synthase.(1999). *J Neurophysiol* 1999;81:494–497.
 80. Hawkins RD. NO Honey, I Don't Remember. (1996). *Neuron*. 16:465–7.
 81. Hilderman, Casey, Pojoga. P -Diadenosine 5 - tetraphosphate modulates L-arginine and L-

- citrulline uptake by bovine aortic endothelial cells. (2000). *Arch Biochem Biophys* 375: 124–130
82. Hogervorst, Bandelow, Moffat. Increasing testosterone levels and effects on cognitive functions in elderly men and women: a review. (2005). *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord.* 4(5): 531-40
 83. Hogervorst, Williams, Budge, Riedel, Jolles. The nature of the effect of female gonadal hormone replacement therapy on cognitive function in post-menopausal women: a meta-analysis. (2000). *Neuroscience.* 101 (3):485-512.
 84. Hopper, Garthwaite. Tonic and phasic nitric oxide signals in hippocampal long-term potentiation. (2006). *J Neurosci.* 26:11513 – 11521.
 85. Hu, Wang, Lee, Trojanowski, Detre, Grossman. Distinct cerebral perfusion patterns in FTLD and AD. (2010). *Neurology.* 75:881–8.
 86. Hurtado, Kohler, de Lange. Next-generation biomarker discovery in Alzheimer’s disease using metabolomics - from animal to human studies. (2018). *Bioanalysis* 2018;10:1525–46.
 87. Hyman, Van Hoesen, Damasio, Barnes. Alzheimer’s disease: cell- specific pathology isolates the hippocampal formation. (1984). *Science.* 225: 1168 – 1170.
 88. Ibáñez, Simó, Martín-Álvarez, Kivipelto, Winblad, Cedazo-Mínguez, *et al.* Toward a Predictive Model of Alzheimer’s Disease Progression Using Capillary Electrophoresis–Mass Spectrometry Metabolomics. (2012). *Analytical Chemistry.* 84:8532–40.
 89. Ivanova, Artusi, Boffa, Zaninotto, Plebani. HPLC determination of plasma dimethylarginines: method validation and preliminary clinical application. (2010). *Clin Chim Acta.* 411:1632–6.
 90. Jeynes, Provias. Significant negative correlations between capillary expressed eNOS and Alzheimer lesion burden. (2009). *Neurosci Lett.* 463:244–8.
 91. Kaiser, Schoenknecht, Kassner, Hildebrandt, Kinscherf, Schroeder. Cerebrospinal Fluid Concentrations of Functionally Important Amino Acids and Metabolic Compounds in Patients with Mild Cognitive Impairment and Alzheimer’s Disease. (2010). *Neurodegenerative Diseases.*
 92. Kan, Lee, Wilson, *et al.* Arginine deprivation and immune suppression in a mouse model of Alzheimer’s disease. (2015). *The Journal of Neuroscience.* 35:5969-5982.
 93. Kaore, Amare, y Kaore. Citrulline: pharmacological perspectives and its role as an emerging biomarker in future. (2013). *Fundam Clin Pharmacol.* 27: 35-50.
 94. Katusic, Austin. Endothelial nitric oxide: protector of a healthy mind. (2014). *Eur Heart J.* 35:888–94.
 95. Keller, Zhang, Yao, Qi. The impact of chronic estrogen deprivation on immunologic parameters in the ovariectomized Rhesus monkey (*Macaca mulatta*) model of menopause. (2001). *J Reprod Immunol.* 50:41–55.
 96. Kim, Schutzler, Schrader, Spencer, Azhar, Deutz, *et al.* Acute ingestion of citrulline stimulates nitric oxide synthesis but does not increase blood flow in healthy young and older adults with heart failure. (2015). *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 09:E915–24.
 97. Kraemer S: The fragile male. (2000). *BMJ.* 321: 1609–1612.
 98. Krumenacker, Hanafy, Murad. Regulation of nitric oxide and soluble guanylyl cyclase. (2004). *Brain research bulletin* 62(6), 505-15.
 99. Kuhn, Harris, Cunningham, Robbins, Summar, Christman. Oral citrulline effectively elevates plasma arginine levels for 24 h in normal volunteers. (2006). *Circulation AHA Scientific Sessions abstract* 1692, p. II-1339.
 100. Galea y Kimura. Sex differences in route-learning, Personality and individual Differences. 14 (1993) 53-65
 101. LaFerla, y Green. Animal Models of Alzheimer Disease. (2012). *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2:a006320
 102. Lavados, Guillón, Mujica, Rojo, Fuentes, Maccioni. Mild cognitive impairment and Alzheimer patients display different levels of redox-active CSF iron. (2008). *Journal Alzheimers Disease.* 2:225-32.

- 103.Lipp y Wolfer. Genetically modified mice and cognition. (1998).*Current Opinion in Neurobiology*. 8; 272-280.
- 104.Lista, Toschi, Baldacci, Zetterberg, Blennow, Kilimann, Teipel, Cavedo, dos Santos, Epelbaum, Lamari, Dubois, Floris, Garaci, Hampel. Diagnostic accuracy of CSF neurofilament light chain protein in the biomarker-guided classification system for Alzheimer's disease. (2017). *Neurochem Int*. 108:355–360.
- 105.Lista y Hampel. Synaptic degeneration and neurogranin in the pathophysiology of Alzheimer's disease. (2016). *Expert Rev Neurother*. 17:47–57.
- 106.Lista, Toschi, Baldacci, Zetterberg, Blennow, Kilimann, Teipel, Cavedo, dos Santos, Epelbaum, Lamari, Dubois, Nisticò, Floris, Garaci, Hampel. Cerebrospinal Fluid Neurogranin as a Biomarker of Neurodegenerative Diseases: A Cross-Sectional Study. (2017). *J Alzheimers Dis*. 59:1327–1334.
- 107.Liu, Liang, Soong . Nitric Oxide, Iron and Neurodegeneration. (2019). *Front Neurosci*. 13:114.
- 108.Lorin, Zeller, Guillard, Cottin, Vergely, Rochette. Arginine and nitric oxide synthase: regulatory mechanisms and cardiovascular aspects. (2014). *Mol Nutr Food Res*. 58:101–16.
- 109.Louin, Neveux, Cynober, Plotkine, Marchand-Leroux, Jafarian-Tehrani. Plasma concentrations of arginine and related amino acids following traumatic brain injury: proline as a promising biomarker of brain damage severity. (2007) *Nitric Oxide*. 17: 91–97.d
- 110.Lourenço, Ledo, Barbosa, Laranjinha. Neurovascular uncoupling in the triple transgenic model of Alzheimer's disease: Impaired cerebral blood flow response to neuronal-derived nitric oxide signaling (2017). *Exp Neurol*; 291:36–43.
- 111.Luckhaus, Flüb, Wittsack, Grass-Kapanke, Jänner, Khalili-Amiri. Detection of changed regional cerebral blood flow in mild cognitive impairment and early Alzheimer's dementia by perfusion-weighted magnetic resonance imaging. (2008). *Neuroimage*. 40:495–503
- 112.Luiking, Ten Have, Wolfe, Deutz. Arginine de novo and Nitric oxide production in disease states. (2012). *Am J Physiol Endocrinol Metab*.
- 113.Luth, Holzer, Gartner, Staufenbiel, Arendt. Expression of endothelial and inducible NOS-isoforms is increased in Alzheimer's disease, in APP23 transgenic mice and after experimental brain lesion in rat: evidence for an induction by amyloid pathology. (2001). *Brain Res*. 913(1): 57-67.
- 114.Maccioni, Rojo, Kuljis. The role of neuroimmunomodulation in Alzheimer's disease. (2009). *Ann NY Acad Sci*. 1153: 240-6.
- 115.Maei, Zaslavsky, Teixeira, Frankland. What is the Most Sensitive Measure of Water Maze Probe Test Performance?. (2009). *Front. Integr. Neurosci*. 3; 4.
- 116.Maki PM., The critical window hypothesis of hormone therapy and cognition: A scientific update on clinical studies. (2013). *Menopause*. 20:695-709.
- 117.Manner, Nicholson, MacLeod. CAT2 arginine transporter deficiency significantly reduces iNOS-mediated NO production in astrocytes. (2003). *Journal of Neurochemistry*. 85, 476-482.
- 118.Marquet-de Rougé, Clamagirand, Facchinetti, Rose, Sargueil, Guihenneuc-Jouyaux, et al. Citrulline diet supplementation improves specific age-related raft changes in wild-type rodent hippocampus. (2013). *Age*. 35:1589–606.
- 119.Martinez-Coria, Green, Billings, Kitazawa, Albrecht, Rammes, et al. Memantine improves cognition and reduces Alzheimer's-like neuropathology in transgenic mice. (2010). *Am J*

- Pathol. 176:870–80,
120. Martinez-Ruiz, Cadenas, Lamas. Nitric oxide signaling: Classical, less classical, and nonclassical mechanisms. (2011). *Free Radic Biol Med* 51(1), 17-29.
 121. McGrattan, McGuinness, McKinley, Kee, Passmore, Woodside, et al. Diet and Inflammation in Cognitive Ageing and Alzheimer's Disease. (2019). *Curr Nutr Rep.* 8:53–65.
 122. Merrill JE: Production and influence of inflammatory cytokines in diseases of the adult central nervous system; in Ader R, Felten DL, Cohen N (eds): (2001). *Psychoneuroimmunology*. San Diego, Academic Press, pp 547–561.
 123. Meulemans A. Electrochemical detection of nitroso-arginine as an intermediate between N-hydroxy-arginine and citrulline. An in vitro versus in vivo study using microcarbon electrodes in neuronal nitric oxide synthase and mice brain. (2000). *Neurosci Lett* 294: 125–129
 124. Mineo, Shaul. Regulation of eNOS in Caveolae. (2012). *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 51–62
 125. Miranda, Espey, Wink: A rapid simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. (2001). *Nitric Oxide: Biol Chem* 5: 62-71.
 126. Moinard, Nicolis, Neveux, et al. Dose- ranging effects of citrulline administration on plasma amino acids and hormonal patterns in healthy subjects: the Citrudose pharmacokinetic study. (2008). *Br J Nutr.* 99:855–62.
 127. Morita, Sakurada, Watanabe, Yamasaki, Doi, Ezaki, Morishita, Miyakex. Effects of oral L-citrulline supplementation on lipoprotein oxidation and endothelial dysfunction in humans with vasospastic angina. (2013). *Immunol. Endocr. Metab. Agents Med. Chem.* 13, 214–220
 128. Morris SM. Arginine Metabolism Revisited. (2016). *The Journal of Nutrition.* 146:2579S – 2586S.
 129. Morris SM Jr. Regulation of arginine availability and its impact on NO synthesis. In: Ignarro LJ (ed) *Nitric oxide: biology and pathobiology*. (2000). chap 11. Academic Press, San Diego, pp 187–197
 130. Mulder, Wahlund, Blomberg, de Jong, van Kamp, Scheltens, et al. Alzheimer's disease is not associated with altered concentrations of the nitric oxide synthase inhibitor asymmetric dimethylarginine in cerebrospinal fluid. (2002). *J Neural Transm.* 109:1203–8.
 131. Nagy, Floyd. Hydroxyl free radical reactions with amino acids and proteins studied by electron spin resonance spectroscopy and spin-trapping. (1984). *Biochim. Biophys. Acta* 790, 238–250
 132. Norris, Schrimpf, Flynn, Morris SM Jr. Enhancement of macrophage microbicidal activity: supplemental arginine and citrulline augment nitric oxide production in murine peritoneal macrophages and promote intracellular killing of *Trypanosoma cruzi*. (1995). *Infect Immun* 63: 2793–2796
 133. Oddo, Caccamo, Shepherd, et al. Triple-Transgenic Model of Alzheimer's Disease with Plaques and Tangles: Intracellular A β and Synaptic Dysfunction. (2003). *Neuron* 39; 409–421.
 134. Ohtsuka, Nakaya. Effect of oral administration of L-arginine on senile dementia. (2000). *Am J Med.* 108:439.
 135. Olsson, Lautner, Andreasson, Öhrfelt, Portelius, Bjerke, Hölttä, Rosén, Olsson, Strobel, Wu, Dakin, Petzold, Blennow, Zetterberg. CSF and blood biomarkers for the diagnosis of Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. (2016). *The Lancet Neurology.* 15:673–684.
 136. Osowska, Moinard, Neveux, Lo, Cynober. Citrulline increases arginine pools and restores nitrogen balance after massive intestinal resection. (2004). *Gut* 53: 1781–1786.
 137. Ota, Monsey, Wu, Young, Schafe. Synaptic plasticity and NO-cGMP-PKG signaling coordinately regulate ERK-driven gene expression in the lateral amygdala and in the auditory thalamus following Pavlovian fear conditioning. (2010). *Learn Mem* 17:221–35.
 138. Otto, Neugebauer, Claus, Soosdorf. Arginine metabolism is markedly impaired in

- polymicrobial infected mice. (2012). *Critical Care*. 16: 412
- 139.Owens IP: Ecology and evolution: sex differences in mortality rate. (2002). *Science*. 297: 2008–2009.
- 140.Pan, Nasaruddin, Elliott, McGuinness, Passmore, Kehoe, et al. Alzheimer's disease-like pathology has transient effects on the brain and blood metabolome. (2016). *Neurobiol Aging*. 38:151–63
- 141.Patten, Germain, Melissa, Slack, Slack. Reactive Oxygen Species: Stuck in the Middle of Neurodegeneration. (2010). *Journal of Alzheimer's Disease*. 20 S357-S367.
- 142.Prast, Philippu. Nitric oxide as modulator of neuronal function. (2001). *Progress in Neurobiology*. 64:51–68.
- 143.Paxinos G. Y Franklin K.B.J. The mouse brain in stereotaxic coordinates. (2013). Editorial Elsevier. Cuarta edición.
- 144.Prince, Wimo, Guerchet, Ali, Wu, Prina. An analysis of prevalence, incidence, cost & trends. Alzheimer's Disease International; London: 2015. World Alzheimer Report 2015. The global impact of dementia.
- 145.Raghavan, Dikshit. L-Citrulline mediated relaxation in the control and lipopolysaccharide-treated rat aortic rings. (2001). *Eur J Pharmacol* 431: 61–69
- 146.Roof, Stein. Gender differences in Morris water maze performance depend on task parameters. (1999). *Physiol. Behav.* 68; 81-86.
- 147.Rojo, Sjöberg, Hernández, Zambrano, Maccioni. Roles of cholesterol and lipids in the etiopathogenesis of Alzheimer's disease. (2006). *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 1-17.
- 148.Romero, Platt, Caldwell, Caldwell. Therapeutic use of citrulline in cardiovascular disease. *Cardiovasc.* (2006). *Drug Rev.* 24 275–290.
- 149.Rosario, Chang, Head, Stanczyk, Pike. Brain levels of sex steroid hormones in men and women during normal aging and in Alzheimer's disease. (2011). *Neurobiol Aging*. 32(4): 604-13
- 150.Rosario, Carroll, Oddo, LaFerla, Pike. Androgens regulate the development of neuropathology in a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease. (2006). *J Neurosci*. 26:13384–9.
- 151.Roubenoff, Castaneda. Sarcopenia-understanding the dynamics of aging muscle. (2001). *JAMA* 286: 1230–1231
- 152.Saucier, Shultz, Keller, Cook, Binsted. Sex differences in object location memory and spatial navigation in Long-Evans rats. 2008. *Anim. Cogn.* 11: 129-137.
- 153.Schmidlin, Fischer, Wiesinger. Transport of L-citrulline in neural cell cultures. (2000). *Dev Neurosci* 22: 393–398
- 154.Schuff, Matsumoto, Kmiecik, Studholme, Du, Ezekiel, et al. Cerebral blood flow in ischemic vascular dementia and Alzheimer's disease, measured by arterial spin-labeling magnetic resonance imaging. (2009). *Alzheimers Dement.* 5:454–6.
- 155.Schwedhelm, Maas, Freese, Jung, Lukacs, Jambrecina, et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of oral L-citrulline and L-arginine: impact on nitric oxide metabolism. (2008). *Br J Clin Pharmacol.* 65:51–9.
- 156.Selkoe D.J. Alzheimer's disease: Genes, Proteins, and Therapy. (2001). *Physiological Reviews*. 81(2); 741-761.
- 157.Shigesada, Tatibana. Enzymatic synthesis of acetylglutamate by mammalian liver preparations and its stimulation by arginine. (1971). *Biochem Biophys Res Commun* 44: 1117–1124
- 158.Shigesada, Tatibana. N-Acetylglutamate synthetase from rat- liver mitochondria. Partial purification and catalytic properties. (1978). *Eur J Biochem* 84: 285–291
- 159.Simon, Karbach, Habermeier, Closs. Decoding the substrate supply to human neuronal nitric oxide synthase. (2013). *PLoS One*. 8:e67707.
- 160.Singh. Y Li. Sex Differences in Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease. (2014). *Front Neuroendocrinol.* 35(3): 385-403.

161. Sisodia y Tanzi. Springer Science & Business Media, LLC, 1era edición, New York, EEUUA. Alzheimer's disease Advances in genetics, molecular and celular biology. (2010):286.
162. Smith, Canter, Christian, et al. Nitric oxide precursors and congenital heart surgery: A randomized controlled trial of oral citrulline. (2006). *J Thorac Cardiovasc Surg.* 132:58-65
163. Sonntag, Ryu, Amirault, Healy, Siegel, McPhie, et al. Late-onset Alzheimer's disease is associated with inherent changes in bioenergetics profiles. (2017). *Scientific Reports*; 7.
164. Sonntag, Ryu, Amirault, Healy, Siegel, McPhie, Forester, Cohen. Late-onset Alzheimer's disease is associated with inherent changes in bioenergetics profiles. (2017). *Nature Scientific Reports.* 7: 14038.
165. Stanhewicz AE, Wenner MM, Stachenfeld NS. Sex differences in endothelial function important to vascular health and overall cardiovascular disease risk across the lifespan. (2018). *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology.* 315:H1569-88.
166. Stevens, Brown. Reference and working memory deficits in the 3xTg-AD mouse between 2 and 15-months of age: a cross-sectional study. (2014). *Behav Brain Res.* 278C:496-505,
167. Stover, Campbell, Van Winssen, Brown. Early detection of cognitive deficits in the 3xTg-AD mouse model of Alzheimer's disease. (2015). *Behav Brain Res.* 289:29-38.
168. Yagi, Galea. Sex differences in hippocampal cognition and neurogenesis. (2019). *Neuropsychopharmacology.* 44; 200-213.
169. Tachikawa, Hirose, Akanuma, Matsuyama, Hosoya. Developmental changes of l-arginine transport at the blood-brain barrier in rats. (2018). *Microvasc Res.* 117:16-21.
170. Takiguchi, Mori. Transcriptional regulation of genes for ornithine cycle enzymes. (1995). *Biochem J* 312: 649-659
171. Tan, Xue, Ma, et al. Partial eNOS deficiency causes spontaneous thrombotic cerebral infraction, amyloid angiopathy and cognitive impairment. (2015). *Mol Neurodegener.* 10:24.
172. Thomas, Heinecke, Ridnour, Cheng, Kesarwala, Switzer, et al. Signaling and stress: The redox landscape in NOS2 biology. (2015). *Free Radic Biol Med.* 87:204-25.
173. Togo, Katsuse, Iseki. Nitric oxide pathways in Alzheimer's disease and other neurodegenerative dementias. (2004). *Neurol. Res.* 26(5), 563-566.
174. Upchurch, Wehner. Differences between inbred strains of mice in Morris water maze performance (1988). *Behaviour Genetics.* 18; 55-68.
175. Vanaja Paul y Ekambaram Perumal. Involvement of nitric oxide in learning and memory processes. (2011). *Indian J Med Res.* 133 (5): 471-478.
176. Vincent, Clerk, Lindner, Klibanov, Clark, Rattigan, et al. Microvascular recruitment is an early insulin effect that regulates skeletal muscle glucose uptake in vivo. (2004). *Diabetes* 53:1418-23.
177. Voikar, Koks, Vasar, Rauvala. Strain and gender differences in the behavior of mouse lines commonly used in transgenic studies. (2001). *Physiol. Behav.* 72; 271-281.
178. Wang, Dickson, Trojanowski, Lee. The levels of soluble versus insoluble brain A β distinguish Alzheimer's disease from normal and pathologic aging. (1999). *Exp Neurol* 158: 328-337.
179. Waugh, Daeschner, Files, McConnell, Strandjord. Oral citrulline as arginine precursor may be beneficial in sickle cell disease: early phase two results. (2001). *J Natl Med Assoc* 90: 363-371
180. Weinstein, Ran, Segal. Sex-associated differences in the regulation of immune responses controlled by the MHC of the mouse. (1984). *J Immunol.* 132:656-661.
181. Wieck A. Oestradiol and psychosis: clinical findings and biological mechanisms. (2011). *Curr Top Behav Neurosci.* 8: 173-187.
182. Wiesinger H. Arginine metabolism and the synthesis of nitric oxide in the nervous system. (2001). *Prog Neurobiol* 64: 365-391
183. Yabuki, Y. *et al.* Oral L-citrulline administration improves memory deficits following transient brain ischemia through cerebrovascular protection. (2013). *Brain Res.* **1520**, 157-167.
184. Yokota, Kawasaki, Iwano, Nakamura, Miyake, Akashi. Citrulline and DRIP-1 Protein (ArgE

- Homologue) in Drought Tolerance of Wild Watermelon. (2002). *Annals of Botany*. 89: 825-832.
- 185.Zetterberg, Skillbäck, Mattsson, Trojanowski, Portelius, Shaw, Weiner, Blennow. Association of Cerebrospinal Fluid Neurofilament Light Concentration with Alzheimer Disease Progression. (2016). *JAMA Neurology*. 73:60.
- 186.Zhang, Kurup, Xu, Carty, Fernandez, Nygaard, et al. Genetic reduction of striatal-enriched tyrosine phosphatase (STEP) reverses cognitive and cellular deficits in an Alzheimer's disease mouse model. (2010). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107:19014–9.
- 187.Zheng, Lin. The role of L-arginine and L-citrulline in activated macrophage against *Toxoplasma gondii* infection in vitro. (1998). *Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi* 16: 326–330.
- 188.Zhu, Belcher y Van derHarst. Healthy aging and disease: role for telomere biology?. (2011). *Clinical Science*. 120; 427–440.
- 189.Ziegler-Graham, Brookmeyer, Johnson y Arrighi. Worldwide variation in the doubling time of Alzheimer's disease incidence rates. (2008). *Alzheimer's & Dementia*. 4;316–323.
- 190.Z. Jonasson. Meta-analysis of sex differences in rodent models of learning and memory: a review of behavioral and biological data. (2005). *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 28



Basic nutritional investigation

Citrulline supplementation improves spatial memory in a murine model for Alzheimer's disease



Katia Martínez-González, M.Sc.^{a,b}, Leonor Serrano-Cuevas, M.D.^c,
Eduardo Almeida-Gutiérrez, M.D., Ph.D.^d, Salvador Flores-Chavez, Ph.D.^e,
Juan Manuel Mejía-Aranguré, M.D.^f, Paola Garcia-delaTorre, Ph.D.^{a,*}

^a Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Neurológicas, Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, México

^b Posgrado en Ciencias Biológicas, Unidad de Posgrado, Edificio A, 1° Piso, Circuito de Posgrados, Ciudad Universitaria, Coyoacán, C.P. 04510, Distrito Federal, México, Universidad Nacional Autónoma de México

^c Coordinación de Unidades Médicas, División de Evaluación y Rendición de Cuentas de los Procesos de Atención Médica en Unidades Médicas de Alta Especialidad, Instituto Mexicano del Seguro Social, México

^d Head of Medical Education and Research, Hospital de Cardiología, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, México

^e Unidad de Investigación Médica en Nutrición, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, México

^f Coordinación de Investigación en Salud, Instituto Mexicano del Seguro Social, México

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 December 2020

Revised 19 February 2021

Accepted 18 March 2021

Keywords:

Nitric oxide

Arginine

Dementia

Hippocampus

Nutritional supplementation

ABSTRACT

Objectives: Alzheimer's disease (AD) correlates with the dysfunction of metabolic pathways that translates into neurological symptoms. An arginine deficiency, a precursor of nitric oxide (NO), has been reported for patients with AD. We aimed to evaluate the effect of citrulline oral supplementation on cognitive decline in an AD murine model.

Methods: Three-month citrulline or water supplementation was blindly given to male and female wild-type and 3 × Tg mice with AD trained and tested in the Morris water maze. Cerebrospinal fluid and brain tissue were collected. Ultra-performance liquid chromatography was used for arginine determinations and the Griess method for NO.

Results: Eight-month-old male 3 × Tg mice with AD supplemented with citrulline performed significantly better in the Morris water maze task. Arginine levels increased in the cerebrospinal fluid although no changes were seen in brain tissue and only a tendency of increase of NO was observed.

Conclusions: Citrulline oral administration is a viable treatment for memory improvement in the early stages of AD, pointing to NO as a viable, efficient target for memory dysfunction in AD.

© 2021 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Alzheimer's disease (AD) is the most common cause of dementia and consists of progressive neurodegeneration characterized by initial memory impairment and cognitive decline [1]. Amyloid and tangle pathologies are specific to AD, and although its precise etiology is still unclear, cardiovascular risk factors (e.g., hypertension, hypercholesterolemia, diabetes mellitus, aging, and sedentary lifestyle) are associated with a higher incidence of AD [2]. At this time, evidence suggests that chronic brain hypoperfusion and cerebrovascular pathology are the earliest clinical markers of AD [3].

Some studies support the hypothesis that AD correlates with the dysfunction of metabolic pathways that are translated into neurological symptoms [4]. In this regard, changes in bioenergetics are part of the normal aging process and even when body-wide, these anomalies affect the brain most substantially because of its exceptionally high-energy requirements [5]. In AD, changes in the glycolysis pathway, a decrease in oxidative metabolism, diminished mitochondrial potential, defective or reduced mitochondria, and insulin-like growth factor 1/insulin resistance have been reported [6].

New metabolomic and lipidomic studies have analyzed changes in the postmortem brains of patients with AD [7]. Some studies implicated the L-arginine (L-Arg) metabolic pathway in the development of AD [8]. Different metabolomic studies suggest that

* Corresponding author. Tel.: +525541455279; fax: +525555780240.

E-mail address: pgarciatorre@gmail.com (P. Garcia-delaTorre).

amino acid levels vary greatly in AD [9], with arginine being one of the most interesting ones because a reduction in this amino acid can affect the citrulline/nitric oxide (NO) pathway [10]. Studies in a rodent model of AD show similar results pointing to a dysregulation of the L-Arg metabolism [11].

Arginine is a semi-essential amino acid in humans that, under certain physiologic conditions with a high demand for arginine, may become essential [12], and is required for NO, creatine, polyamine, and protein synthesis. Arginine and citrulline concentrations are lower in the cerebrospinal fluid of patients with AD [13,14]. However, some studies did not show any changes in the arginine levels of patients with AD [15] or the levels were elevated compared with those of patients with mild cognitive impairment [16].

Geriatric patients with cerebrovascular disease who are treated with oral L-Arg have been shown to improve their cognitive function and reduce their levels of lipid peroxidation [17]. Furthermore, the intracerebroventricular administration of L-Arg has recently been reported to improve spatial memory acquisition of 6.5-month-old female $3 \times$ Tg mice with AD [18].

NO has been shown to be biologically active in the central nervous system and is involved in learning processes and cognitive function [19], because NO helps regulate synaptic plasticity [20] and contributes to long-term potentiation and depression [21]. Deficiency of NO has been implicated in neurodegeneration by promoting endothelial dysfunction, accelerating formation and accumulation of amyloid peptides, reducing synaptic plasticity, activating microglia, and evoking neuroinflammation [20,22].

Citrulline is a precursor of L-Arg, which is oxidized to NO and citrulline by the action of endothelial NO synthase (NOS). The exogenous administration of L-Arg has been reported to restore NO bioavailability [23], and may offer a therapeutic strategy to control NO metabolism disorders and improve cardiovascular function [24].

Citrulline supplementation for 3 mo reduced age-related hippocampus raft changes, resulting in raft patterns similar to those in young animals. All citrulline-treated rats had low levels of amyloid protein precursor (APP) and low levels of C99-APP-Cter, the first-step fragment of amyloidogenic APP [25]. Citrulline has also been reported to protect against H_2O_2 -induced hippocampal long-term potentiation (LTP) impairment, and aged rats fed with citrulline can reach a robust LTP, similar to the LTP recorded for younger rats [26]. Citrulline has shown beneficial effects in various neurological diseases associated with oxidative stress, such as transient ischemic stroke [27].

Our aim in this study was to evaluate the effect of citrulline oral supplementation on cognitive decline in the progression of AD in a murine model and a possible way in which citrulline could increase NO levels.

Methods

Animals

All procedures were performed in accordance with the current rulings in Mexican law (NOM-062-ZOO-1999) and with the approval of local science and ethics committees (R-2012-785-049). This study is in concordance with the Animal Research Reporting of In Vivo Experiments guidelines.

Homozygous male and female $3 \times$ Tg mice with AD ($3 \times$ Tg-AD; B6; 129-Psen1^{tm1Mpm} Tg [APP^{Swe}, tauP301L] 1Lfa) were used as an AD murine model, and B6129SF2/J WT male and female mice were used as controls. The mice were bred in our laboratory from parents purchased from The Jackson Laboratory, and housed in the Bioterio de la Coordinación de Investigación en Salud. The mice were housed in plastic cages, woodchip bedding, and metal wire

covers in groups of 2 to 4 same-sex littermates. The mice were housed in a colony room maintained at a 12:12 light/dark cycle at 20 to 22°C, and provided with water and food ad libitum.

Citrulline supplementation

Mice from each strain (5 mo old) were randomized into two groups: a control (8 mice/group) and an experimental (10 mice/group) group. Mice from the experimental group received 1 g/kg of malate citrulline dissolved in water fed orally with an esophageal cannula stainless steel, once daily for 12 wk. The control group was fed with the same volume of water according to the mouse's weight. The weight of the animals was measured every week during the experiment. No significant treatment-related effects were observed.

Memory task

The task consisted of four trials per day for 4 consecutive d. Trials were assigned with pseudorandom starting points (E, SE, NW, N) each day. A total of 16 trials were performed facing the wall at one of four starting positions, and allowed to locate the submerged platform. Mice were allowed to swim freely until they found the platform and the time required to find the platform (escape latency) was recorded. Mice were allowed to stay on the platform for 10 more s prior to their removal to the rest cage. If unable to locate the platform within 60 s, the mouse was gently guided to the platform and allowed to stay on it for 10 s and its escape latency was recorded as 60 s.

Twenty-four hours after the last trial, a 60 s probe trial was performed without the escape platform. The mice were released into the tank individually and allowed to swim for 60 s. Behavioral experiments on probe day were recorded using a camera, and the recorded video files were analyzed using Kinovea Software Analysis. Latency, crosses, average speed, and distance traveled were measured.

Cerebrospinal fluid collection

Two days after probe day, 8-month-old animals were anesthetized with pentobarbital and NaCl 0.9% (50 mg/kg) administered intraperitoneally. Cerebrospinal fluid (CSF) samples were taken from the cisterna magna by puncture, and the volume obtained was approximately 4 μ l per animal. A pull of four mice's CSF was used to measure arginine levels.

Tissue collection

The mice were decapitated, the brain was carefully removed, and tissue from the hippocampus was dissected, frozen in dry ice, and stored at -80°C.

Arginine determination

Ultra-performance liquid chromatography (UPLC) analyses were performed with a modified method based on Ivanova et al. [28] and Jong and Teerlink [29], updated for Waters UPLC. Briefly, homogenates from the hippocampus in saline solution (100 μ l) were diluted in 100 μ l phosphate-buffered saline (PBS) buffer (NaH₂PO₄ 10mM, NaCl 140mM, pH 8.0), centrifuged to precipitate and separate debris, and supernatants were saved and frozen to -70°C. A stock solution of derivatization reagent was prepared by dissolving 10 mg of o-phthalaldehyde.

Samples were extracted by solid-phase extraction on 1-ml Waters Oasis MCX SPE columns. The SPE columns were loaded with a mixture of 25 μ l of PBS-extracted tissue, 175 μ l water, 100 μ l

of internal standard (10 $\mu\text{mol/L}$ monomethyl arginine dissolved in HCl 10 mM), 100 μl HCl 10 mM, and 600 μl PBS buffer. The dried residue was dissolved in a 50 μl working solution of derivatization reagent, and the reaction was stopped by the addition of 50 μl of 0.2 M KH_2PO_4 .

Chromatographic separations were performed on Waters UPLC Acquity system using an Acquity C-18 BEH UPLC column 1.7 μm particle size. Fluorescence was monitored at λ excitation 340 nm and λ emission 455 nm. Arginine was clearly separated with baseline resolution between signals. The retention times were 2.5 to 2.8 min (maximum peak signal).

Nitric oxide determination

The method used herein, developed by Miranda et al. [30], consists of the vanadium (III)-dependent reduction of nitrate to nitrite. Tissue homogenate was deproteinized by filtration in Microcon YM-50 and centrifuged at 12000 rpm during 40 min at 20°C. Next, 50 μl were obtained and 100 μl of deionized H₂O, 150 μl of 0.8% VCL3 in 1N HCl, 150 μl of 2% sulfanilic acid, and 0.1% NED were consecutively added. Samples were incubated at 37°C for 60 min and centrifuged at 9000 rpm for 10 min. The supernatant was measured at 545 nm in a monochromator-based optic Spectrophotometer EPOCH. A standard curve was prepared by serial dilutions of NaNO_3 100 μM .

Statistical analysis

Derived from the aforementioned background, the hypotheses were specified before the data were collected, and an analytic plan was specified.

An analysis of variance for repeated measures was used to analyze Morris water maze training and a Tukey post hoc was used to detect differences between the groups. A Kruskal–Wallis test was used to analyze latency time on probe day and arginine levels. Subsequently, we used the multiple testing correction of the Benjamini and Hochberg false discovery rate (FDR) [31] for differences between the groups (treatment, strain). To analyze differences between sex and age in the same strain, we used the Mann–Whitney test.

Finally, a Spearman's r test was used to evaluate the correlation between arginine and ON levels and arginine and memory performance in both strains. All statistics were performed between the experimental and control groups of each treatment.

Results

After a 3-mo period of citrulline or water administration, animals were trained and tested in the Morris water maze task. During training, all groups reduced their escape latency as shown by an analysis of variance with repeated measures with an effect on trials ($F[15,45] = 7.75$; $P < 0.001$; $F[15,45] = 14.05$; $P < 0.001$) but no effect of strain ($F[1,525] = 1.60$; $P > 0.05$; $F[1,405] = 0.85$; $P > 0.05$) or treatment ($F[1,525] = 0.92$; $P > 0.05$; $F[1,405] = 0.80$; $P > 0.05$) for male and female mice, respectively.

A Mann–Whitney test showed the differences in latency on probe day (24 h after the last trial) between female (median: 6.52) and male transgenic mice (median: 33.54; $U = 0$; $P < 0.001$). Since differences between the sexes were found, every subsequent analysis was done separately.

On probe day, a Kruskal–Wallis test showed significant differences in latency between the male groups ($H[3] = 18.28$; $P < 0.001$). After the multiple test correction of Benjamini and Hochberg FDR, we found differences between transgenic and wild-type water-treated mice ($P < 0.001$), showing that transgenic mice

had cognitive impairment at the time of the test. Differences between transgenic citrulline and water-treated mice ($P < 0.05$) and between water-treated transgenic and citrulline and water-treated wild-type mice ($P < 0.05$; $P < 0.021$, respectively) were also shown. No differences were found between treatments for wild-type male mice (Fig. 1A).

For target crossings, a Kruskal–Wallis test showed significant differences between the male groups ($H[3] = 18.42$; $P < 0.001$). After the multiple test correction of Benjamini and Hochberg FDR, we found differences between water-treated transgenic and water and citrulline-treated wild-type mice ($P < 0.001$), between water-treated wild-type mice and citrulline-treated transgenic mice ($P < 0.05$), and between citrulline- and water-treated transgenic mice ($P < 0.05$; Fig. 1B).

The distance traveled by the animals before finding the place where the platform was located during training was also measured (Fig. 1C). A Kruskal–Wallis test shows differences between the groups in male mice ($H[3] = 14.76$; $P < 0.05$). After the multiple test correction of Benjamini and Hochberg FDR, we found differences between water-treated transgenic mice and citrulline and water-treated wild-type mice ($P < 0.05$; $P < 0.05$, respectively), and also observed differences between water- and citrulline-treated transgenic mice ($P < 0.05$). The average speed was measured to determine if treatment could induce differences in speed between the groups. A Kruskal–Wallis test showed no differences between the male groups ($H[3] = 6.16$; $P > 0.05$), showing no effect of citrulline on performance.

On the other hand, female mice strains showed no differences for either measurement. A Kruskal–Wallis test showed no statistical difference of escape latency ($H[3] = 1.65$; $P > 0.05$; Fig. 2A), target crossings ($H[3] = 1.13$; $P > 0.05$; Fig. 2B), distance travelled ($H[3] = 0.64$; $P > 0.05$; Fig. 2C), or average speed ($H[3] = 1.54$; $P > 0.05$). These results suggest that female transgenic mice do not have memory deficits in this task compared with its control group. Moreover, citrulline supplementation had no effect on wild-type or transgenic female mice.

Arginine levels in the CSF of citrulline-treated transgenic (180%) and wild-type (134%) male mice showed an increase compared with water-treated mice, as did the levels in citrulline-treated transgenic (180%) and wild-type (126%) female mice. However, the collected CSF was only sufficient for one measurement by high-performance liquid chromatography of a pull of 4 mice; hence, no statistical analyses were performed on these data.

Arginine levels in the hippocampus can be seen in Figure 3A. A Kruskal–Wallis test for the male hippocampus showed significant differences between the groups ($H[3] = 8.96$; $P = 0.030$), but a multiple test correction of Benjamini and Hochberg FDR indicated no changes between the groups. In the same way, no significant differences in arginine levels in the hippocampus ($H[3] = 5.35$; $P > 0.05$) between treatments or strains for female mice were found (Fig. 3B).

Nitrite levels (Fig. 4A) were determined in the hippocampus of 3 \times Tg mice with AD and wild-type male mice. A Kruskal–Wallis test showed differences between the groups ($H[3] = 13.03$; $P < 0.001$). After the multiple test correction of Benjamini and Hochberg FDR, significant differences between transgenic citrulline-treated mice and water- and citrulline-treated wild-type mice ($P < 0.05$; $P < 0.05$, respectively) were observed.

For female mice, a Kruskal–Wallis showed differences between the groups ($H[3] = 12.52$; $P < 0.001$). The multiple test correction of Benjamini and Hochberg FDR revealed differences between water-treated transgenic and wild-type mice ($P < 0.05$), citrulline-treated transgenic and water-treated wild-type mice ($P < 0.05$), and citrulline-treated transgenic and wild-type mice ($P < 0.05$; Fig. 4B).

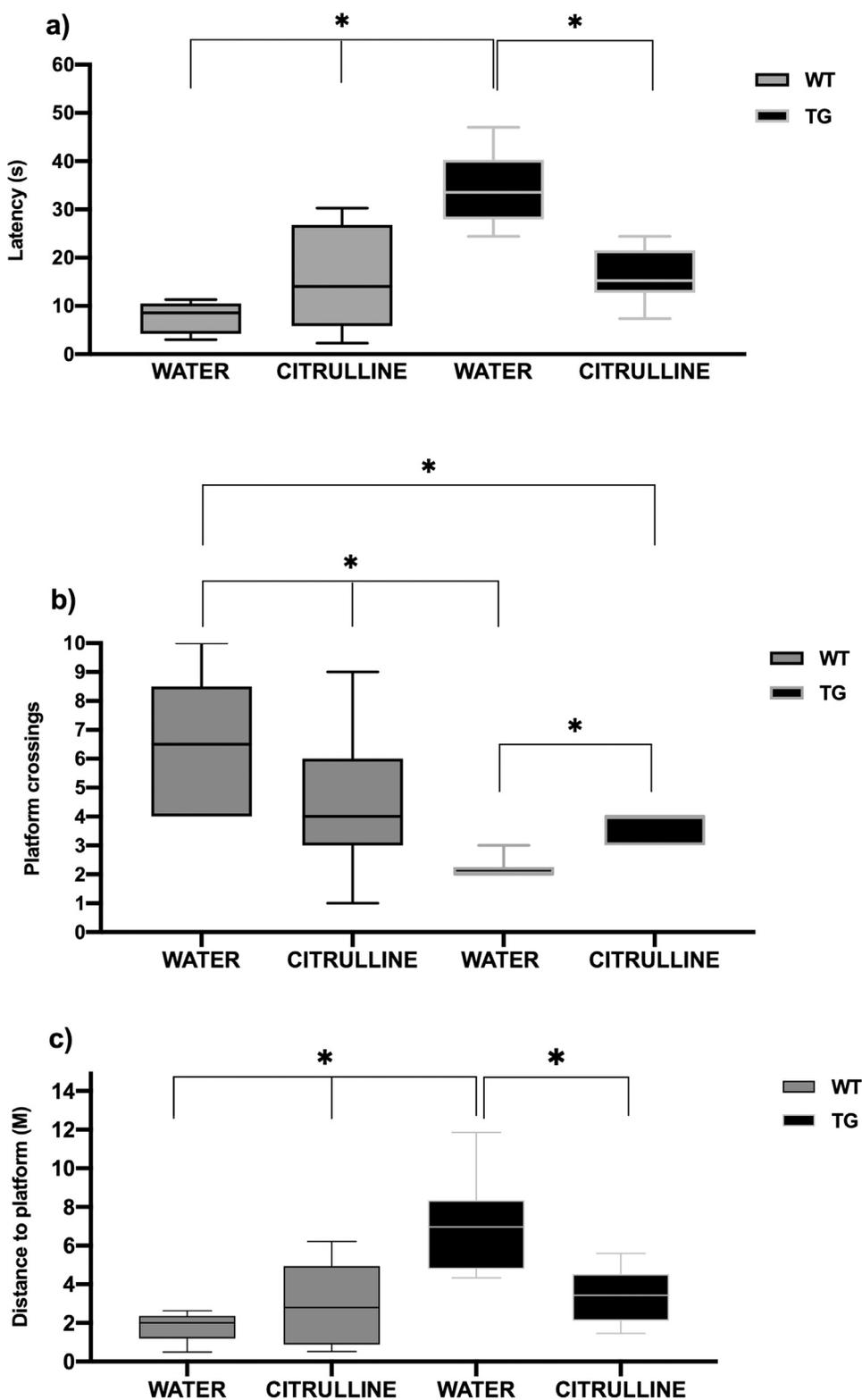


Fig. 1. Morris water maze probe for male transgenic and wild-type mice. Grey boxes represent the wild-type strain and black boxes the transgenic strain, with (A) latency (time in s); (B) target crossings (number of crosses in the place where the platform was presented during training); and (C) distance travelled by the animal before finding the platform. * $P < 0.05$.

Finally, a Spearman r test showed no correlation between arginine levels and latency ($r = -0.50$; $P = 0.21$) nor between arginine and NO levels ($r = -0.60$; $P = 0.35$) for citrulline-treated male $3 \times$ Tg mice with AD. No correlation was found for either arginine and NO ($r = 0.60$; $P = 0.41$) or arginine and latency ($r = 0.60$;

$P = 0.16$) when analyzing female citrulline-treated $3 \times$ Tg mice with AD.

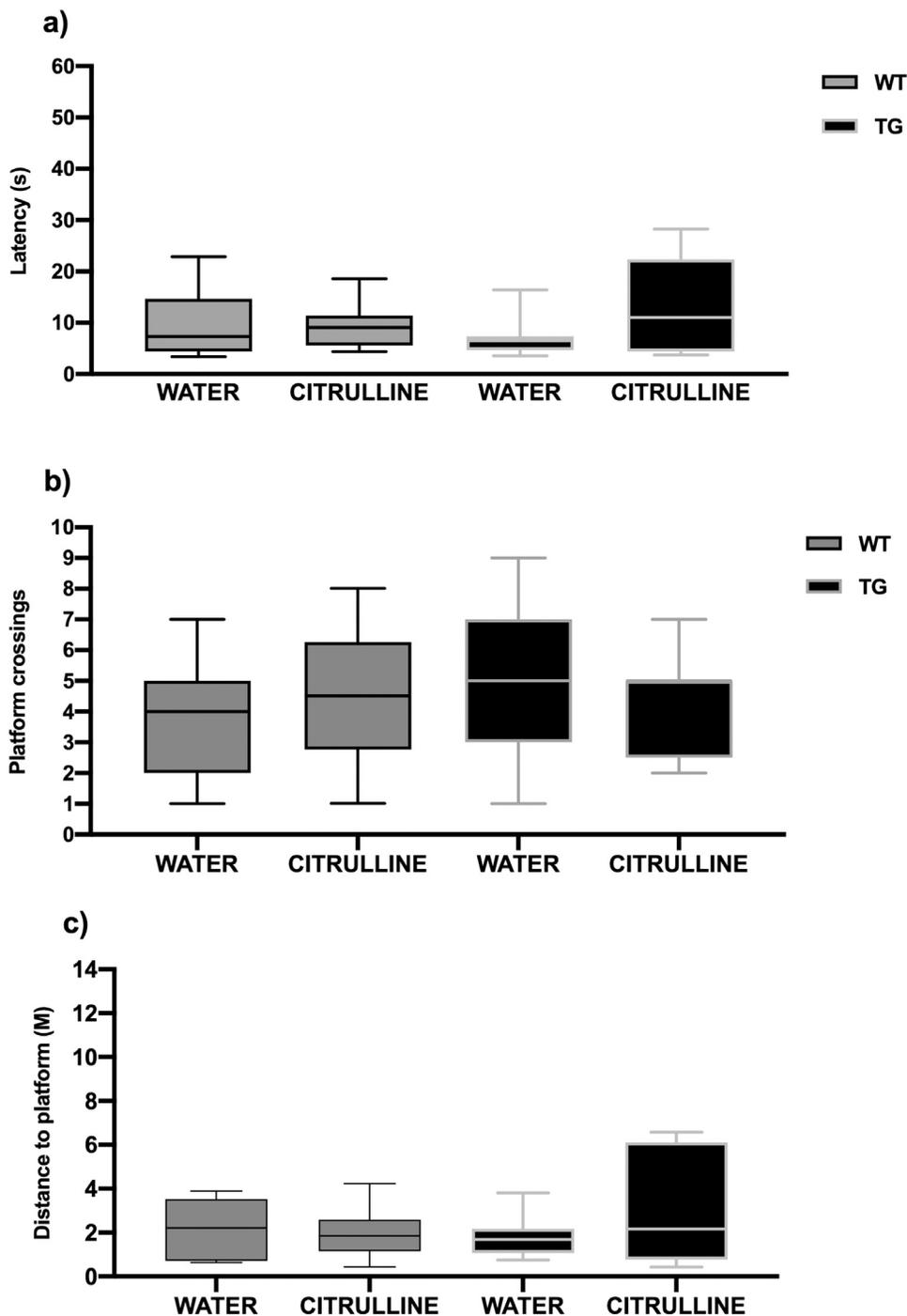


Fig. 2. Morris water maze probe is presented for female transgenic and wild-type mice. Grey boxes represent the wild-type strain and black boxes the transgenic strain, with (A) latency (time in s); (B) target crossings (number of crosses in the place where the platform was presented during training); and (C) distance travelled by the animal before finding the platform. * $P < 0.05$.

Discussion

Three months of citrulline supplementation to male transgenic mice with AD improved memory performance in a spatial task when the administration started at 5 mo of age. We found that 8 mo-old male transgenic mice showed cognitive decline compared with the wild-type group, and that this deterioration can be prevented if the animals have citrulline supplementation. No changes in acquisition were found for either group; hence, the improvement we see is specific to long-term memory.

However, unlike male mice, transgenic female mice showed no memory deficit compared with their wild-type counterparts; hence, no improvement could be recorded. Of note, there is a significant effect of sex in the performance of the Morris water maze for the $3 \times$ Tg AD model. We found differences between male and female mice without taking into account citrulline supplementation. Female mice have a better performance independent of the strain for this specific memory task.

Other studies using $3 \times$ Tg mice with AD reported inconsistencies between the sexes in their results depending on the mem-

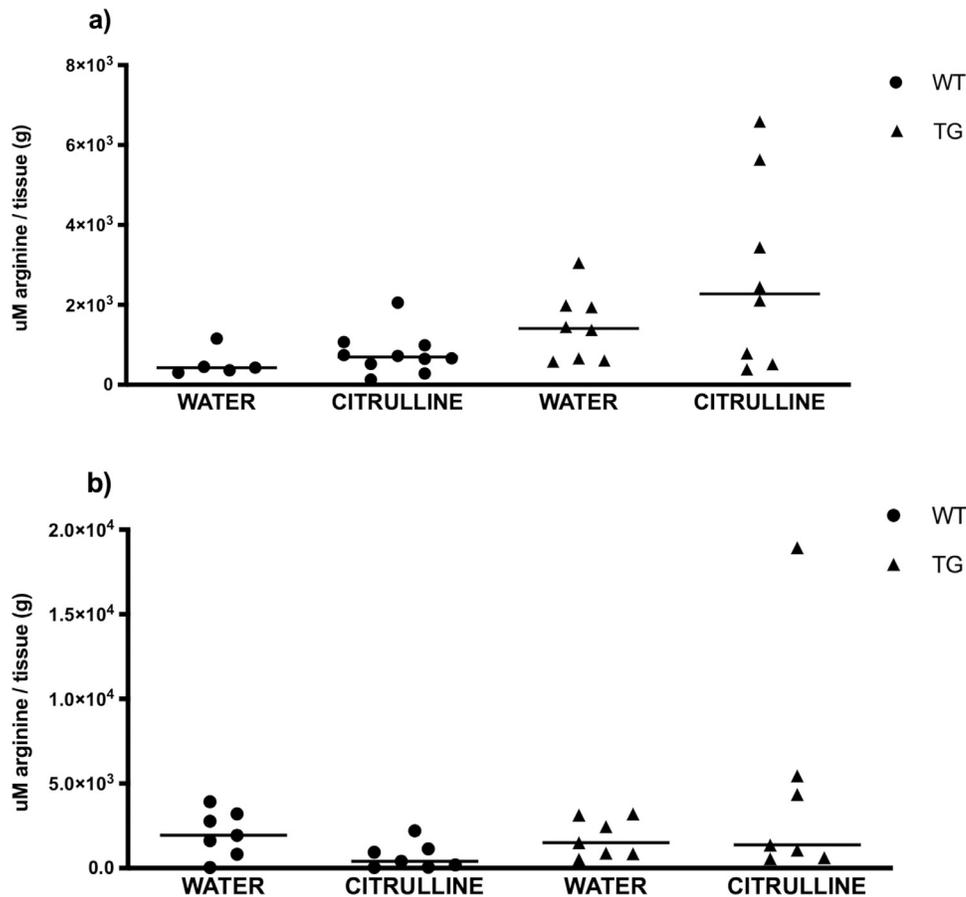


Fig. 3. Arginine levels in hippocampus tissue for wild type (circles) and transgenic (triangles) strains for (A) male and (B) female mice. * $P < 0.05$.

ory tasks used [32], which constitutes one of the limitations of working with this murine model. An evaluation of performance in different behavioral tests of cognitive function, such as spontaneous alternation in the Y-maze, novel object recognition, the Barnes maze, and cued and contextual fear memory tasks, showed that in general, female mice have a better cognitive performance than male mice at 6.5 mo of age [32].

Genetic strain [33,34] and sex of the mouse [35] can influence spatial performance. Male and female mice use different strategies or exhibit differential cue use to solve the same maze. Female mice use a cue response strategy and male mice use a place strategy [36]. A meta-analysis across studies of radial arm and Morris water mazes showed that female mice had a slight advantage in the Morris water maze while male mice showed a slight advantage in the radial arm maze [37]. Sex differences in learning strategies have also been reported [38–40] and could suggest that male and female mice rely on different brain regions during spatial training that contributes to sex differences in performance during spatial navigation [36].

No changes in speed were seen between treated and nontreated mice, suggesting no effect on performance by citrulline supplementation. When evaluating the biologic implications of citrulline supplementation, we found that arginine increases in the CSF in both strains and both sexes. However, we were only able to analyze one pull of four mice samples, leaving us with no statistical analysis and constituting one of the limitations of this study.

On the other hand, arginine in the hippocampus was not different between treatments. Our data are in accordance with what has been found in humans, where no differences in arginine levels in the hippocampus between patients and controls have been re-

ported [41]. Arginine pools can remain intact since the arginine required for different pathways is taken from the extracellular space [42], which could explain the lack of changes found in this work.

When measuring NO as a product of arginine, we found no changes in $3 \times$ Tg citrulline-treated male and female mice with AD compared with water-treated mice from the same strain. The regulatory roles of NO are complex, in part because NO concentrations can vary greatly in magnitude. Physiological concentrations can vary from low nanomolar up to low micromolar. Lower concentrations of NO may not be sufficient to activate all signaling pathways but instead will stimulate pathways triggered by highly reactive substrates for NO [43]. Hence, no statistically significant changes can still have a biologic impact. However, we have no way of proving this with experiments done to date.

Regarding transgenic and wild-type mice, we found that NO levels in both male and female transgenic water-treated mice were higher than those in water-treated wild-type mice. These results are in concordance with an earlier report where in young male $3 \times$ Tg mice with AD, the NO peak amplitude tended to be lower. During age progression, the NO peak amplitude increased in $3 \times$ Tg mice with AD but remained unchanged in control mice. In old-aged mice, the NO peak amplitude was significantly higher compared with those of the age-matched controls [44].

L-citrulline also acts as a partial arginase inhibitor that hydrolyzes L-Arg into L-ornithine and urea; thus, further increasing L-Arg availability for NO production. Even more, an arginase inhibitor that also increases L-citrulline levels has been shown to reverse AD symptoms [45].

We also measured hydroxyl radical levels to discard a negative effect of citrulline supplementation on oxidative stress lev-

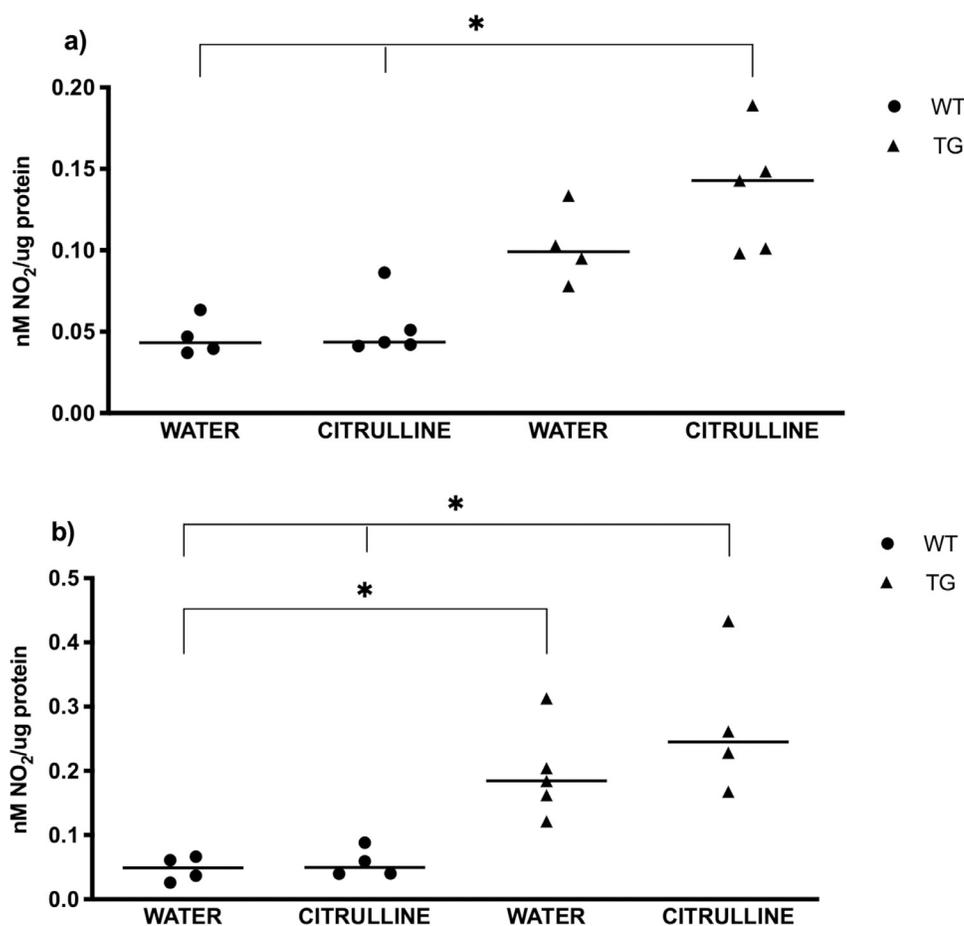


Fig. 4. Nitric oxide levels in hippocampus tissue for wild type (circles) and transgenic (triangles) strains for (A) male and (B) female mice. * $P < 0.05$.

els, and found no differences in hydroxyl radical levels between citrulline- and water-treated animals (data not shown). Finally, we found a significant increase in NO in female transgenic mice compared with their male counterparts. In this regard, sex hormones are known to influence endothelial function through their effects on agonists and contribute to key functional differences between male and female mice related to endothelial function and cardiovascular disease risk [46]. Estrogen binding to activated endothelial NOS promotes the production of NO [47], which could affect cognition.

At this time, our findings prove a positive effect of citrulline supplementation on spatial memory. However, we can only suggest that the memory improvement observed could be related to an increase in arginine as seen for the CSF and further NO production as seen by the slight increase shown herein. NO produced by neuronal NOS is known to function as an important modulator of neuronal function, acting on the release of neurotransmitters [48], synaptogenesis, long-term potentiation, and long-term depression [49]. Furthermore, NO deficiency has been implicated in neurodegeneration by promoting endothelial dysfunction, accelerating the formation and accumulation of amyloid peptides, reducing synaptic plasticity, activating microglia, and evoking neuroinflammation [22].

Other mechanisms that have not been considered in this study but could have contributed to the memory improvement are the proven effect citrulline has against oxidative-induced toxicity or in the rescue of impaired N-methyl-D-aspartate receptor-dependent LTP in the hippocampus of rats displaying age-related oxidative damage [26]. Additionally, oral citrulline supplementation has been

proven to have a protective effect against brain protein carbonylation and can reduce serum and lipoprotein susceptibility to oxidation [50]. Moreover, citrulline supplementation can reduce the age-related hippocampus raft conformation and lower levels of APP and C99-APP-Cter [25]. All these phenomena have been reported as an effect of citrulline supplementation and are related to AD; hence, some pathways could have influenced our results, independent from NO production.

Conclusions

Citrulline oral administration, a nontoxic supplement that has been previously used for other ailments, improves spatial memory in an AD murine model. Citrulline should be considered a potential supplement for memory improvement in the early stages of AD. However, much work remains to be done to disclose citrulline's full potential and precise mechanisms of action.

Acknowledgments

This paper constitutes part of the Ph.D. in Biological Science graduate requisites of Katia Leticia Martínez-González who thanks Posgrado en Ciencias Biológicas, Biología Experimental, and acknowledges the scholarships provided by CONACyT (294248) and IMSS (99096757). The authors thank Dr Rodrigo Mondragón Lozano for his technological support and Ariadna Galvan Flores for her help with the design and elaboration of the graphical abstract. This research was possible thanks to the support of B. Eng. Sergio Becerril Zavala from Pronat. This work was supported by the

Fondo de Investigación en Salud, Instituto Mexicano del Seguro Social (project number FIS/IMSS/PROT/G17-2/1754).

References

- [1] DeTure MA, Dickson DW. The neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener* 2019;14:32.
- [2] Austin SA, Santhanam AV, Katusic ZS. Endothelial nitric oxide modulates expression and processing of amyloid precursor protein. *Circ Res* 2010;107:1498–502.
- [3] Bourasset F, Ouellet M, Tremblay C, Julien C, Do TM, Oddo S, et al. Reduction of the cerebrovascular volume in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neuropharmacology* 2009;56:808–13.
- [4] Cai H, Cong WN, Ji S, Rothman S, Maudsley S, Martin B. Metabolic dysfunction in Alzheimer's disease and related neurodegenerative disorders. *Curr Alzheimer Res* 2012;9:5–17.
- [5] Sonntag KC, Ryu WI, Amirault KM, Healy RA, Siegel AJ, McPhie DL, et al. Late-onset Alzheimer's disease is associated with inherent changes in bioenergetics profiles. *Sci Rep* 2017;7.
- [6] Ferrer I. Altered mitochondria, energy metabolism, voltage-dependent anion channel, and lipid rafts converge to exhaust neurons in Alzheimer's disease. *J Bioenerg Biomembr* 2009;41:425–31.
- [7] Paglia G, Stocchero M, Cacciatore S, Lai S, Angel P, Alam MT, et al. Unbiased metabolomic investigation of Alzheimer's disease brain points to dysregulation of mitochondrial aspartate metabolism. *J Proteome Res* 2016;15:608–18.
- [8] Graham SF, Chevallier OP, Elliott CT, Hölscher C, Johnston J, McGuinness B, et al. Untargeted metabolomic analysis of human plasma indicates differentially affected polyamine and L-arginine metabolism in mild cognitive impairment subjects converting to Alzheimer's disease. *PLoS One* 2015;10:e0119452.
- [9] Hurtado MO, Kohler I, de Lange EC. Next-generation biomarker discovery in Alzheimer's disease using metabolomics - From animal to human studies. *Bioanalysis* 2018;10:1525–46.
- [10] Gueli MC, Taibi G. Alzheimer's disease: Amino acid levels and brain metabolic status. *Neurolog Sci* 2013;34:1575–9.
- [11] Yu J, Kong L, Zhang A, Han Y, Liu Z, Sun H, et al. High-throughput metabolomics for discovering potential metabolite biomarkers and metabolic mechanism from the APPswe/PS1dE9 transgenic model of Alzheimer's disease. *J Proteome Res* 2017;16:3219–28.
- [12] Agarwal U, Didelija IC, Yuan Y, Wang X, Marini JC. Supplemental citrulline is more efficient than arginine in increasing systemic arginine availability in mice. *J Nutr* 2017;147:596–602.
- [13] Ibáñez C, Simó C, Martín-Álvarez PJ, Kivipelto M, Winblad B, Cedazo-Minguez A, et al. Toward a predictive model of Alzheimer's disease progression using capillary electrophoresis-mass spectrometry metabolomics. *Anal Chem* 2012;84:8532–40.
- [14] Arlt S, Schwedhelm E, Kölsch H, Jahn H, Linnebank M, Smulders Y, et al. Dimethylarginines, homocysteine metabolism, and cerebrospinal fluid markers for Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2012;31:751–8.
- [15] Mulder C, Wahlund LO, Blomberg M, de Jong S, van Kamp GJ, Scheltens P, et al. Alzheimer's disease is not associated with altered concentrations of the nitric oxide synthase inhibitor asymmetric dimethylarginine in cerebrospinal fluid. *J Neural Transm* 2002;109:1203–8.
- [16] Kaiser E, Schoenknecht P, Kassner S, Hildebrandt W, Kinscherf R, Schroeder J. Cerebrospinal fluid concentrations of functionally important amino acids and metabolic compounds in patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Neurodegener Dis* 2010;7:251–9.
- [17] Ohtsuka Y, Nakaya J. Effect of oral administration of L-arginine on senile dementia. *Am J Med* 2000;108:439.
- [18] Fonar G, Polis B, Meirson T, Maltsev A, Elliott E, Samson AO. Intracerebroventricular administration of L-arginine improves spatial memory acquisition in triple transgenic mice via reduction of oxidative stress and apoptosis. *Transl Neurosci* 2018;9:43–53.
- [19] Hawkins RD. No honey, I don't remember. *Neuron* 1996;16:465–7.
- [20] Dubey H, Gulati K, Ray A. Amelioration by nitric oxide (NO) mimetics on neurobehavioral and biochemical changes in experimental model of Alzheimer's disease in rats. *Neurotoxicology* 2018;66:58–65.
- [21] Liu C, Liang MC, Soong TW. Nitric oxide, iron and neurodegeneration. *Front Neurosci* 2019;13:114.
- [22] Katusic ZS, Austin SA. Endothelial nitric oxide: Protector of a healthy mind. *Eur Heart J* 2014;35:888–94.
- [23] Lorin J, Zeller M, Guillard JC, Cottin Y, Vergely C, Rochette L. Arginine and nitric oxide synthase: Regulatory mechanisms and cardiovascular aspects. *Mol Nutr Food Res* 2014;58:101–16.
- [24] Citrulline: From metabolism to therapeutic use. *Nutrition* 2013;29:479–84.
- [25] Marquet-de Rougé P, Clamagirand C, Facchinetti P, Rose C, Sargueil F, Guihenneuc-Jouyau C, et al. Citrulline diet supplementation improves specific age-related raft changes in wild-type rodent hippocampus. *Age* 2013;35:1589–606.
- [26] Ginguay A, Regazzetti A, Laprevote O, Moinard C, De Bandt JP, Cynober L, et al. Citrulline prevents age-related LTP decline in old rats. *Sci Rep* 2019;9:20138.
- [27] Yabuki Y, Shioda N, Yamamoto Y, Shigano M, Kumagai K, Morita M, et al. Oral L-citrulline administration improves memory deficits following transient brain ischemia through cerebrovascular protection. *Brain Res* 2013;1520:157–67.
- [28] Ivanova M, Artusi C, Boffa GM, Zaninotto M, Plebani M. HPLC determination of plasma dimethylarginines: Method validation and preliminary clinical application. *Clin Chim Acta* 2010;411:1632–6.
- [29] de Jong S, Teerlink T. Analysis of asymmetric dimethylarginine in plasma by HPLC using a monolithic column. *Anal Biochem* 2006;353:287–9.
- [30] Espey MG, Miranda KM, Thomas DD, Wink DA. Distinction between nitrosating mechanisms within human cells and aqueous solution. *J Biol Chem* 2001;276:30085–91.
- [31] Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: A practical and powerful approach to multiple testing. *J Royal Statist Soc Series B (Methodol)* 1995;57:289–300.
- [32] Stover KR, Campbell MA, Van Winnen CM, Brown RE. Early detection of cognitive deficits in the 3 × Tg-AD mouse model of Alzheimer's disease. *Behav Brain Res* 2015;289:29–38.
- [33] Upchurch M, Wehner JM. Differences between inbred strains of mice in Morris water maze performance. *Behav Gen* 1988;18:55–68.
- [34] Adams B, Fitch T, Chaney S, Gerlai R. Altered performance characteristics in cognitive tasks: Cof the albino ICR and CD1 mouse strains. *Behav Brain Res* 2002;133:351–61.
- [35] Vöikar V, Köks S, Vasar E, Rauvala H. Strain and gender differences in the behavior of mouse lines commonly used in transgenic studies. *Physiol Behav* 2001;72:271–81.
- [36] Yagi S, Galea LAM. Sex differences in hippocampal cognition and neurogenesis. *Neuropsychopharmacology* 2019;44:200–13.
- [37] Jonasson Z. Meta-analysis of sex differences in rodent models of learning and memory: A review of behavioral and biological data. *Neurosci Biobehav Rev* 2005;28:811–25.
- [38] Grissom EM, Hawley WR, Hodges KS, Fawcett-Patel JM, Dohanich GP. Biological sex influences learning strategy preference and muscarinic receptor binding in specific brain regions of prepubertal rats. *Hippocampus* 2013;23:313–22.
- [39] Galea LAM, Kimura D. Sex differences in route-learning. *Personal Indiv Diff* 1993;14:53–65.
- [40] Cherney ID, Brabec CM, Runco DV. Mapping out spatial ability: Sex differences in way-finding navigation. *Percept Mot Skills* 2008;107:747–60.
- [41] Liu P, Fleete MS, Jing Y, Collie ND, Curtis MA, Waldvogel HJ, et al. Altered arginine metabolism in Alzheimer's disease brains. *Neurobiol Aging* 2014;35:1992–2003.
- [42] Morris SM. Arginine metabolism revisited. *J Nutr* 2016;146:2579S–86.
- [43] Thomas DD, Heinecke JL, Ridnour LA, Cheng RY, Kesarwala AH, Switzer CH, et al. Signaling and stress: The redox landscape in NOS2 biology. *Free Radic Biol Med* 2015;87:204–25.
- [44] Lourenço CF, Ledo A, Barbosa RM, Laranjinha J. Neurovascular uncoupling in the triple transgenic model of Alzheimer's disease: Impaired cerebral blood flow response to neuronal-derived nitric oxide signaling. *Exp Neurol* 2017;291:36–43.
- [45] Polis B, Srikanth KD, Gurevich V, Gil-Henn H, Samson AO. L-Norvaline, a new therapeutic agent against Alzheimer's disease. *Neural Regenat Res* 2019;14:1562–72.
- [46] Stanhewicz AE, Wenner MM, Stachenfeld NS. Sex differences in endothelial function important to vascular health and overall cardiovascular disease risk across the lifespan. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2018;315:H1569–88.
- [47] Kim KH, Bender JR. Rapid, estrogen receptor-mediated signaling: Why is the endothelium so special? *Sci STKE* 2005;2005:e28.
- [48] Christopherson KS, Bretz DS. Nitric oxide in excitable tissues: Physiological roles and disease. *J Clin Invest* 1997;100:2424–9.
- [49] Prast H, Philippu A. Nitric oxide as modulator of neuronal function. *Progr Neurobiol* 2001;64:51–68.
- [50] Moinard C, Le Plénier S, Noirez P, Morio B, Bonnefont-Rousselot D, Kharchi C, et al. Citrulline supplementation induces changes in body composition and limits age-related metabolic changes in healthy male rats. *J Nutr* 2015;145:1429–37.