



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

**CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA OLFATORIA
DEL RATÓN TRIPLE TRANSGÉNICO PARA LA
ENFERMEDAD DE ALZHEIMER (3xTg-AD)**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)

PRESENTA

GUILLERMO CORONAS SÁMANO

DIRECTORA DE TESIS

DRA. SOFÍA YOLANDA DÍAZ MIRANDA



Campus Juriquilla, Querétaro, Octubre 2011.

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Los miembros del Comité Tutoral certificamos que la tesis elaborada por: Guillermo Coronas Sámano, cuyo título es: “Caracterización de la respuesta olfatoria del ratón triple transgénico para la enfermedad de Alzheimer (3xTg-AD)” se presenta como uno de los requisitos para obtener el grado de Maestría en Ciencias (Neurobiología) y cumple con los criterios de originalidad y calidad requeridos por la División de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Presidente

Dra. Rosalinda Guevara Guzmán

Secretaria (Tutora)

Dra. Sofía Yolanda Díaz Miranda

Vocal

Dra. Josefina Ricardo Garcell

Suplente

Dra. Wendy Portillo Martínez

Suplente

Dr. Fernando Peña Ortega

Aprobado por el Comité Académico

Dra. María Teresa Morales Guzmán

Coordinadora del Programa

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL DEPARTAMENTO DE NEUROBIOLOGÍA DEL DESARROLLO Y NEUROFISIOLOGÍA DEL INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO, BAJO LA DIRECCIÓN DE LA DRA. SOFÍA YOLANDA DÍAZ MIRANDA.

AGRADECIMIENTOS

A mi *Alma Mater* la Universidad Nacional Autónoma de México por inculcarme el glorioso espíritu de superación, por ser partícipe de su grandeza académica desde la Licenciatura hasta el Posgrado y por todos los valores que me ha dado para ser un mejor estudiante y un mejor ser humano.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por otorgarme el apoyo económico para la realización de este proyecto.

A la Dra. Sofía Y. Díaz Miranda por su apoyo académico, por creer en mí para realizar este proyecto, por sus consejos y su motivación de seguir adelante en el trabajo pese a las adversidades, y sobre todo por inculcarme a ser un mejor investigador.

A la Técnico Académico M. en C. Azucena Aguilar Vázquez por su enseñanza y apoyo técnico en el cuidado y manejo de los animales experimentales, en la estandarización de los experimentos de Biología Molecular y en su participación en las tareas conductuales.

A la Dra. Wendy Portillo Martínez por su excelente participación académica desde el principio de este trabajo, por su apoyo incondicional y por su tutoría en el desarrollo de todas las pruebas conductuales de este trabajo, estaré siempre agradecido contigo.

A la Dra. Josefina Ricardo Garcell por permitirme ser su alumno, por su gran enseñanza en la Neurobiología y por instruirme en todo momento el gusto por la investigación. Muchas gracias por ser parte de mi formación académica.

A la Dra. Rosalinda Guevara Guzmán por sus críticas y comentarios en la corrección del trabajo escrito y su gran participación en el estudio sobre la pérdida de la olfacción en el Alzheimer.

Al Dr. Fernando Peña Ortega por su excelente revisión en este trabajo, por sus excelentes aportaciones en el escrito, por confiar en mí y por su apoyo académico incondicional, le estoy muy agradecido.

Al Dr. Raúl Paredes Guerrero por su valiosa aportación académica y por la facilitación de recursos para la realización de todas las pruebas conductuales de este trabajo.

Al Dr. Víctor Ramírez Amaya por sus críticas oportunas y apoyo en el desarrollo de este proyecto.

Al Laboratorio de Conducta Sexual por el uso de recursos para la realización de las pruebas conductuales.

Al Técnico Académico MVZ. Francisco Camacho Barrios por su valiosa aportación en el trabajo experimental en el Laboratorio de Conducta Sexual.

A la Psicóloga Verónica Tonántzin Pineda por su participación en el cuidado y manejo de los animales utilizados en este proyecto.

Al Laboralista Jorge Servin de la Cruz por su trabajo en el mantenimiento del Laboratorio de Neuromorfometría y Desarrollo.

A la Laboralista María Juana Cárdenas Luna por su dedicación en el mantenimiento del Laboratorio de Conducta Sexual.

A la Universidad de Irvine, California por la donación de los ratones triples transgénicos.

A la Dra. Gohar Gevorgyan Markosian por su excelente apoyo en mi vida académica y por la donación de anticuerpos para mi proyecto.

Al Biol. Exp. Gonzalo Asariel Acero Galindo por su brillante apoyo en mi formación como investigador y por sus oportunas observaciones en el trabajo escrito.

Al Bioterio del Instituto de Neurobiología y en especial al MVZ. Martín García Servin por su dedicación al cuidado y manejo de los animales.

A la Unidad de Proteogenómica por la caracterización molecular del ratón triple transgénico.

A la Biblioteca del Instituto de Neurobiología, en especial al Jefe de Biblioteca, el MVZ. Román Pacheco Barrita por su excelente trabajo en la coordinación y mantenimiento de libros, revistas y tesis, además de su excelente trato en el préstamo de los ejemplares.

A la Coordinación de Posgrado en especial a la M. en C. Leonor Casanova por su buen desempeño en todos los de trámites académicos.

A mis compañeros del laboratorio de Neuromorfometría y Desarrollo: a la M.V.Z. Eurídice Padilla, al Dr. Vicente Beltrán, y a la M. en C. Irma González por sus excelentes consejos y aportaciones en el transcurso de mi Maestría, los aprecio mucho. También agradezco el trabajo de los estudiantes Sendar D. Nery Flores y Francisco J. Pozos Varela por su participación en la caracterización de los ratones transgénicos.

A mis compañeros del laboratorio de Conducta Sexual: la M. en C. Rebeca Corona, al Q.F.B. Antonio Cabrera, a la Quim. Dulce Arzate y a la Biol. Nancy Unda por su gran apoyo y discusión de mi trabajo, muchas gracias por su amistad.

A la estación de Radio SINAPSIS en especial a la Dra. Patricia García Horsman y al canal de televisión de CABLECOM-Querétaro en especial a la Mtra. Amelia Kobeh por la difusión de este trabajo.

DEDICATORIAS

La realización de mis logros académicos no sería posible sin el apoyo de mis padres, por lo que les dedico este trabajo porque son las personas más importantes de mi vida y gracias a ustedes mis sueños se cumplen. A mi mamá Choclis por estar conmigo siempre y apoyarme en todo aún cuando mis nervios me invaden, gracias a ti soy un mejor ser humano. A mi papá el Vikingo Mayor por tu apoyo incondicional, por tu gran ejemplo de responsabilidad y astucia, por enseñarme que la diversión la encuentro en la dedicación de mi trabajo, por ti soy mejor profesionalista y mejor investigador. A mi Benjas por querernos mucho y alegrarnos la vida con sus ladridos. A ustedes los amo mucho.

A mi Familia Sámano-Jiménez. Tíos: Lala y Javier, primas: Auri, Lili y Carmita.

A mi Familia Coronas-Moreno. Tíos: Tere y Junior, primas: Cinthya, Suzel, Michelle y a mi hermano Memo.

A mi Familia Coronas-Kababie. Tíos: Reyna y Marcos, primos: Alicia, Sharon y a mi hermano Moy.

A mi Familia Zozaya. Tíos: Lily y Jean, Eva y Will, Lina y Juan, Ana y Fernando primas: Evita y Stephany.

A mi abuelita Bitá.

Y como mención especial a los que hoy ya no están presentes pero que siempre los llevo en mi corazón, les dedico mi trabajo: Mi abuela Profa. Aurea Velázquez Flores †, mi abuelo Dr. Guillermo Coronas Gutiérrez †, mi tía Biol. Ernestina Coronas Gutiérrez †, mi tía Eva Habana †, y a mi abuela Angelita †.

Finalmente dedico mi trabajo a todos aquellos sedientos de conocimiento en este hermoso, magnífico, misterioso y controvertido mundo de la investigación.

PENSAMIENTOS

“Viaț a este un drum întortocheat spre moarte”

Guillermo Coronas Sámano

En el transcurso de mi carrera de Biología, así como en este posgrado en Neurobiología, además de adquirir un extenso bagaje científico, también aprendí a valorar la vida y aprender de ella día a día. La Biología y la Neurobiología han estado presentes en mi ser desde la infancia y la investigación científica ha sido parte de mi vida cotidiana en mi existir. Estoy muy orgulloso de haber estudiado este posgrado y sigo convencido de que en nuestro país necesita del trabajo cotidiano de personas comprometidas con la Ciencia y la investigación, para buscar soluciones a los acontecimientos que nos aquejan a diario como son las enfermedades, la contaminación ambiental y la pobreza.

Lo que he aprendido en lo largo de mi vida académica es que un paciente con Alzheimer muere en vida, porque terriblemente se olvida de los acontecimientos más importantes de su existencia, además de las personas que alguna vez amó y todos sus recuerdos se esfumarán cruelmente con el paso del tiempo inevitable. El miedo de su entorno y de las personas a las que no volverá a reconocer, es un sentimiento inquietante que siente en cada momento, además del sentimiento de tristeza que envarga en el entorno familiar. Por esto, pienso en la importancia de cada uno de nosotros, no importando el área profesional en que nos desempeñemos, a cuidar de nuestra salud y a valorar cada día de nuestros días porque la vida es única y gracias al amor y a la educación que me han brindado mis padres, también pienso que es sumamente maravillosa.

RESUMEN

La Enfermedad de Alzheimer es un desorden neurodegenerativo que se caracteriza por pérdida de la memoria y por presentar en el enfermo síntomas neuropsiquiátricos y conductuales, los cuales se le han atribuido a la sobreproducción del péptido β -amiloide formando las placas amiloideas en las neuronas y también por la hiperfosforilación de la proteína tau, formando las redes neurofibrilares. Se han diseñado diferentes modelos animales que intentan reproducir las características patológicas para el estudio de esta enfermedad. Un modelo que se generó recientemente es el ratón triple transgénico para la Enfermedad de Alzheimer (3xTg-AD), el cual es un "knock-in" para las tres proteínas implicadas en la EA, PS1M146V, APPSwe y tauP3001, diseñado por Oddo et al. (2003). Se ha propuesto como un síntoma temprano de esta enfermedad la disminución olfatoria de los pacientes. Las alteraciones en el olfato pueden producir pérdida del apetito, lo cual se acompañan con pérdida de peso y un estado nutricional pobre. El objetivo de este estudio fue determinar si el 3xTg-AD presenta alteraciones en la percepción de olores sexuales y de olores volátiles de alimentos. Los ratones que se utilizaron en este experimento fueron hembras 3xTg-AD y silvestres (129/C57BL/6) las cuales fueron divididas en tres grupos de diferentes edades: Grupo 1) 4-5 meses; Grupo 2) 10-11 meses y Grupo 3) 16-18 meses. Seis animales por grupo fueron utilizados en tres pruebas: 1) motivación sexual incentiva., 2) preferencia sexual (orina) y 3) discriminación de olores volátiles de alimentos (fresa y canela). Los resultados sugieren un deterioro olfatorio en hembras de 10-11 meses porque no son capaces de discriminar olores de fresa y canela. Y por otro lado, un deterioro en su motivación sexual a partir de los 4-5 meses de edad y una deficiencia en su preferencia sexual a partir de los 10-11 meses al no discriminar olores sexualmente relevantes.

ABSTRACT

Alzheimer is a neurodegenerative disease, characterized by memory loss and neuropsychiatric or behavioral symptoms, due to the over neuronal exposition of the amyloid beta peptide forming amyloid plaques, and the hyper-phosphorylated tau this gives as a result neurofibrillary tangles. There have been developed several models to attempt replicate this disease. Such is the case of Alzheimer's Disease (AD) Triple Transgenic Model (3xTg-AD, which is "knock-in" to PS1M146V APPSwe and tauP3001), designed by Oddo et al. (2003). A decrement in the olfactory capacity during the beginning of AD has been proposed as an early symptom of this disease. Alterations in olfaction can induce loss of appetite, which leads to loss of weight and to a poor nutritional state. The aim of this study was to determine if 3xTg-AD mice have early alterations in the perception of sexually relevant and volatile odorants. Female mice (3xTg-AD and wild type, 129/C57BL/6) were divided into three groups of different ages: Group 1) 4-5 months; Group 2) 10-11 months and Group 3) 16-17 months. Six animals per group were tested in three tasks: 1) discrimination of volatile odorants (strawberries and cinnamon); 2) sexual preference (male urine) and 3) sexual motivation (approach behavior to sexual male stimuli). Our results suggest an olfactory deficit in females mice of 10-11 months-of-age because they were not able to discriminated between strawberries and cinnamon. On the other hand, an olfactory deficit in females mice of 16-17 months-of-age because they were not able to discriminated sexually relevant odorants.

ABREVIATURAS

EA	Enfermedad de Alzheimer
Aβ	β -amiloide
3xTg-AD	Ratón triple transgénico para la enfermedad de Alzheimer
MNFs	Marañas neurofibrilares
APP	Proteína Precursora de Amiloide
PSEN	Presenilina
ApoE	Apolipoproteína E
FTPDP-17	Demencia Frontotemporal con Parkinsonismo ligado la cromosoma 17
IDE	Enzima Degradadora de Insulina
AINES	Anti Inflamatorios No Esteroideos
AL	Ácido Lipoico
PIB	Compuesto Pittsburg B
PET	Tomografía por Emisión de Positrones
BOP	Bulbo Olfatorio Principal
EO	Epitelio olfatorio
OVN	Órgano vomeronasal
BOA	Bulbo Olfatorio Accesorio

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1 Enfoque histórico de la enfermedad de Alzheimer (EA)	2
2.2 Generalidades de la EA	3
2.3 Alteraciones microscópicas de la EA	5
2.3.1 Procesamiento de la Proteína Precursora de Amiloide (APP) y generación del péptido β -Amiloide ($A\beta$)	6
2.3.1.1 Vía no amiloidogénica	6
2.3.1.2 Vía amiloidogénica	7
2.3.2 Mutaciones que afectan la producción de la $A\beta$	8
2.3.3 Agregados amiloides	9
2.3.4 Hipótesis de la cascada amiloide	9
2.4 Alteraciones macroscópicas de la EA	11
2.5 Tratamiento de la EA	13
2.6 Diagnóstico de la EA	16
2.7 El sistema olfatorio en mamíferos	17
2.8 Vía olfatoria	18
2.9 Alteraciones en el sistema olfatorio en la EA	21
2.10 Modelos experimentales para la EA	27
2.11 Modelo del ratón triple transgénico para la EA	28
3. JUSTIFICACIÓN	30
4. HIPÓTESIS	30
5. OBJETIVOS	31

5.1 Objetivo General	31
5.2 Objetivos particulares	31
6. SUJETOS, MATERIAL Y MÉTODOS	31
6.1 Sujetos	31
6.2 Motivación sexual incentiva	32
6.3 Preferencia olfatoria	33
6.4 Discriminación olfatoria a olores relacionados a alimentos	34
6.5 Análisis estadístico	35
7. RESULTADOS	36
7.1 Motivación sexual incentiva	36
7.1.1 Distancia recorrida y velocidad de desplazamiento	36
7.1.2 Registro de tiempo de compartimientos incentivos vacíos	37
7.1.3 Motivación sexual incentiva a los 4-5 meses de edad	38
7.1.4 Motivación sexuales incentiva a los 10-11 meses de edad	39
7.1.5 Motivación sexuales incentiva a los 16-18 meses de edad	41
7.2 Preferencia olfatoria	43
7.2.1 Preferencia olfatoria a los 4-5 meses de edad	43
7.2.2 Preferencia olfatoria a los 10-11 meses de edad	44
7.2.3 Preferencia olfatoria a los 16-18 meses de edad	46
7.3 Discriminación olfatoria de olores volátiles relacionados a alientos	47
7.3.1 Discriminación olfatoria a los 4-5 meses de edad	48
7.3.2 Discriminación olfatoria a los 10-11 meses de edad	49
7.3.3 Discriminación olfatoria a los 16-18 meses de edad	50
8. DISCUSIÓN	52
9. CONCLUSIONES	55

10. BIBLIOGRAFÍA	56
11. FIGURAS	67
12. TABLAS	69

1. INTRODUCCIÓN

La Enfermedad de Alzheimer (EA) es la causa principal de demencia en adultos mayores que es caracterizada por un decremento cognitivo, pérdida de la memoria y por síntomas neuropsiquiátricos o de conducta (Piacentini et al., 2008). Actualmente, esta neuropatología afecta alrededor de 20 millones de personas y se estima que esta cifra se podría duplicar en el año 2020 o incluso aumentar a 80 millones en el 2040 debido al crecimiento en la expectativa de vida (Ferri et al., 2005). La EA se caracteriza por la formación de placas seniles constituidas por agregados del péptido β -amiloide ($A\beta$), por las redes neurofibrilares de la proteína tau hiperfosforilada, por degeneración neuronal, por pérdida de sinapsis y por gliosis reactiva, que se correlacionan con un deterioro cognitivo y la pérdida de la memoria (Rogawski et al., 2003; Bojarzki et al., 2007). El grupo del Dr. La Ferla en California, desarrolló el modelo triple transgénico para la enfermedad de Alzheimer (3xTg-AD), el cual es “knock-in” para las tres proteínas precursoras de la enfermedad ($PS1_{M146V}$, APP_{Swe} y tau_{P3001}), siendo este el modelo más reciente para el estudio del desarrollo de las placas amiloides y de la hiperfosforilación de la tau en las regiones cerebrales (hipocampo y la corteza frontal, entre otras) en donde se integran las funciones cognitivas tanto de roedores como en humanos (Oddo et al., 2003). Un síntoma temprano que se presenta en humanos que desarrollan esta enfermedad es la pérdida gradual de la olfacción a medida que avanza la patología, y dado que hasta ahora no se cuenta con un diagnóstico eficaz para detectar la EA en su etapa temprana, se ha propuesto el desarrollo de diferentes pruebas olfatorias acompañadas de distintas evaluaciones cognitivas que intentan integrar un diagnóstico clínico y con ello, establecer un posible tratamiento que ayude a retardar la progresión de la enfermedad (Wesson y Wilson, 2010). Por otro lado, en la literatura sólo se cuenta con un reporte de Cassano et al., 2011, el cual hace una evaluación de la conducta olfatoria de olores volátiles a los 18 meses de edad en el 3xTg-AD. Sin embargo, el presente trabajo es el primero en hacer una evaluación cronológica en ratones hembras 3xTgAD de la conducta olfatoria para los olores de relevancia sexual y para olores volátiles relacionados a alimentos. Lo anterior con la

finalidad de validar el modelo experimental en esta función olfatoria y con ello, validar que se asemeje esta conducta a la deficiencia olfatoria en humanos.

2. ANTECEDENTES

2.1 Enfoque histórico de la enfermedad de Alzheimer (EA)

El primer caso reportado de la Enfermedad de Alzheimer (EA) es el de Auguste D., una mujer de 51 años que fue internada en el Hospital de Frankfurt, Alemania en Noviembre de 1901, presentando un cuadro clínico caracterizado por celos exagerados a su marido, un impedimento cognitivo progresivo, alucinaciones, delirios, y un deterioro en el comportamiento social y agresividad que padeció durante 5 años. Después del fallecimiento de Auguste el 8 de Abril de 1906, a la edad de 56 años, el Dr. Aloysius “Alois” Alzheimer describió dos características distintivas en el cerebro de esta paciente, las cuales fueron consideradas como un diagnóstico definitivo de la enfermedad: presencia de placas amiloideas y marañas neurofibrilares (Wolfe, 2002), junto con ciertos cambios arterioescleróticos (pérdida de elasticidad de las arteria) (Ferri et al., 2005), asociados a la pérdida neuronal y gliosis reactiva (He et al., 2010).

Fue el 03 de Noviembre de 1906, en la trigésima séptima Conferencia de la Sociedad de Psiquiatras del Sudoeste de Alemania en Tübingen, donde el Dr. Alzheimer dio a conocer a la comunidad científica las características clínicas y neuropatológicas de la enfermedad, que posteriormente adoptaría su nombre cuando Emil Kraepelin mencionara por primera vez “Enfermedad de Alzheimer” para referirse a esta patología de tipo senil (Goedert y Spillantini, 2006). (Ver figura 1). Aunque no fue el primero en describirla, antes Oscar Fisher, Francesco Bonfiglio y Graetano Perusinia, citado por Ciprian et al., 2011.

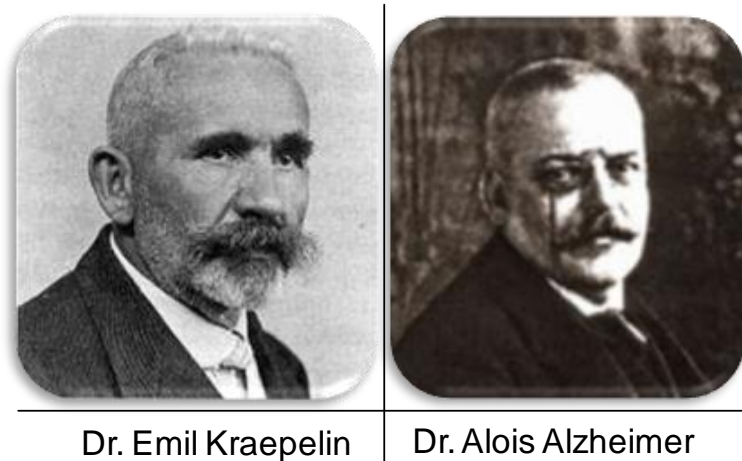


Figura 1. A la izquierda se muestra la fotografía del Dr. Emil Kraepelin quien fuera el primer médico de cabecera de la enferma Augusta Deter, y a la derecha se muestra el retrato del Dr. Alois Alzheimer quien fue el primero en caracterizar la enfermedad demencial que años después llevaría su nombre. Fotografías tomadas de www.psicomundo.org (izquierda) y de www.alzheimer-europe.org (derecha).

2.2 Generalidades de la EA

La EA está considerada como la causa principal de demencia en adultos mayores de edad, y se puede definir como un padecimiento neurodegenerativo del sistema nervioso central caracterizado por un deterioro progresivo de las funciones cerebrales superiores. El término demencia deriva del latín “demens, dementatus” que significa sin mente. La demencia es definida por la Organización Mundial de la Salud como: un síndrome debido a una enfermedad del cerebro, generalmente de naturaleza crónica o progresiva, en la que se alteran varias funciones corticales superiores que repercuten en la actividad cotidiana del enfermo.¹

Una conciencia notable del impacto social en la EA, ha dado como resultado esfuerzos grandes en la investigación con el fin de determinar su nosología, sin embargo, la causa de esta enfermedad aún falta por ser esclarecida. La EA, por su alta incidencia poblacional, adquiere gran importancia, debido a las implicaciones que pueden repercutir en el ámbito social, político y económico, que se acompaña del impacto psicológico fuerte en los familiares de quien la padece (Girones et al., 2002).

¹ <http://www.fundacionalzheimeresp.org>

Se estima que el número de personas que actualmente sufren la EA son aproximadamente 24 millones en todo el mundo, lo cual podría duplicarse a 42 millones en el 2020, y hasta 81 millones en el 2040, asumiendo que no haya cambios en la mortalidad, y de no contar con una estrategia efectiva de prevención o tratamiento curativo. Los seis países que presentaron el número más grande de personas con EA en el 2001 fueron: China (5 millones), la Unión Europea (5 millones), los Estados Unidos de América (2.9 millones), Japón (1.1 millones), Rusia (1.1 millones) e India (1 millón) (Ferri et al., 2005). En lo que respecta a México, son más de 350,000 personas las que son afectadas por la EA, y mueren por ella anualmente 2,030 pacientes (www.innn.salud.gob.mx). Es preocupante que el 60.1% del total de los enfermos con demencia habiten en países en vías de desarrollo, ya que se prevé que la cifra aumentará a 64.5% en 2020 y a 71.2% en 2040 (Ferri et al., 2005).

La prevalencia de la EA en diferentes grupos de edad son: 2.5% (65-74 años), 4% (75-79 años), 11% (80-84 años) y 24% (85-94). La EA es la cuarta causa de muerte en países industrializados, por debajo de las enfermedades cardíacas, el cáncer y traumatismos cerebrovasculares (Nussbaum y Ellis, 2003). La EA afecta a individuos de todas las razas y grupos étnicos, y es ligeramente más frecuente en mujeres de edad avanzada que en hombres (Aguzzi y O'Connor, 2010).

La mayoría de los casos de EA son esporádicos y afecta en gran parte a personas mayores de 65 años, sin embargo, aproximadamente el 5% del total de los pacientes, presenta un patrón de herencia dominante (Enfermedad de Alzheimer Familiar). Los genes que hoy día se conoce que son alterados y que se asocian a las formas familiares de inicio precoz son: el gen de la proteína precursora amiloide (APP) localizado en el cromosoma 21, el gen de la presenilina 1 (PS1) localizado en el cromosoma 14 y el gen de la presenilina 2 (PS2) localizado en el cromosoma 1 (Girones et al., 2002, Walsh y Selkoe, 2007). Esta última también llamada EA presenil o temprana comienza antes de los 65 años de edad y se han identificado genes diferentes cuyas mutaciones ocasionan la acumulación del péptido β -amiloide ($A\beta$), y dicha agregación en el cerebro juega un papel importante en esta enfermedad (Krüger et al., 2011). Se ha descrito la susceptibilidad genética ligada a la apolipoproteína E, la

cual tiene tres alelos que codifican para tres isoformas diferentes de apolipoproteína E (E2, E3 y E4). Los individuos que producen la isoforma E4 tienen mayor riesgo de padecer la EA (Palop et al., 2006, Acosta-Baena et al., 2011).

Sin embargo la manifestación mayor de la enfermedad es considerada actualmente la de tipo esporádico por los factores de riesgo que la propician, los cuales pueden estar ligados al comportamiento humano desde los hábitos en la dieta hasta la contaminación de tipo ambiental. Así los estudios epidemiológicos sugieren que personas con bajos niveles de educación, con un historial de trauma cerebral, con un consumo alto de calorías, o un estilo de vida sedentaria, son las que tienen el mayor riesgo de presentar la EA (Mayeux, 2003, Mattson, 2004).

Sin importar cual factor sea el responsable del desarrollo de la enfermedad, sea hereditario o espontáneo, los síntomas que presenta el paciente son los mismos, y por ello se han generado diversos diagnósticos que se basan en distintos criterios (Bilbul y Schipper, 2011).

2.3 Alteraciones microscópicas

Con respecto a las alteraciones microscópicas que se presentan, la EA se puede definir como un desorden neurodegenerativo caracterizado de manera patológica por una degeneración progresiva y por el depósito de agregados del péptido beta de A β conocidos como placas seniles (Plant et al., 2003, Mattson, 2004). Se ha reportado que la acumulación de A β forma agregados que desencadenan cascadas patogénicas, caracterizadas por estrés oxidativo, inflamación y neurotoxicidad, que culminan con la pérdida neuronal y deterioro del sistema de neurotransmisores que provocan la demencia (Näslund et al., 2000, Bar-Am et al., 2005). Los depósitos de A β de tipo fibrilar han sido asociados con anomalías sinápticas e incluso con la desintegración de redes neuronales (Palop et al., 2006, Haass y Selkoe, 2007).

Otra característica de tipo anatomopatológico de la EA es la presencia de las marañas neurofibrilares (MNFs), las cuales son filamentos helicoidales pareados intraneuronales que resultan de la hiperfosforilación de proteínas tau. Estas

formaciones están asociados a ubiquitina y son reflejo de la destrucción de microtúbulos y neurofilamentos, manifestando el daño y posterior muerte neuronal (Mattson, 2004; Pérez et al., 2007). Las placas de A β y las MNFs están presentes principalmente en regiones del cerebro como la corteza entorrinal, el hipocampo, el cerebro anterior basal y la amígdala, las cuales están relacionadas con los procesos de aprendizaje, la memoria, y las conductas emocionales (Mattson, 2004). En los estudios en animales de experimentación se ha confirmado que son estas las áreas donde se inicia la patología y que son el sustrato funcional para la integración de tipo espacial como es el modelo experimental del reconocimiento de objetos y de contexto (Billings et al., 2007).

2.3.1 Procesamiento de la Proteína Precursora de Amiloide (APP) y generación del péptido β -amiloide (A β)

Un evento central en la enfermedad es la alteración del proceso proteolítico de la proteína precursora de amiloide (APP), la cual es una glicoproteína de tipo I transmembranal (695 a 770 aminoácidos de longitud), que da como resultado la producción y agregación de las formas neurotóxicas del A β (Nunan y Small, 2000; Carter et al., 2010). Una vez que se determinó la secuencia de la A β fue posible purificar, secuenciar y clonar el gen localizado en el cromosoma 21 que codifica a la APP (Mattson, 2004, Haass y Selkoe, 2007). El A β es un producto de la endoproteólisis de la APP, la cual se lleva a cabo por cortes secuenciales de grupos de enzimas o complejos enzimáticos conocidos como: α -, β - y γ -secretasas. Se han identificado tres enzimas con actividad de α -secretasas todas ellas pertenecientes a la familia ADAM., de desintegrinas y metaloproteinasas (ADAM9, ADAM10 y ADAM17) (LaFerla et al., 2007). La división y el procesamiento de APP puede ser diferenciado en las vías: no amiloidogénica y amiloidogénica.

2.3.1.1 Vía no amiloidogénica

En esta vía, el procesamiento de la APP inicia por la actividad de la α -secretasa en la región C-terminal produciendo un péptido de 10 kDa con una longitud de 83

aminoácidos (C83) y liberando un ectodominio N-terminal soluble no amiloidogénico (sAPP α), el cual es liberado al medio extracelular. El péptido resultante C83, se mantiene en la membrana y de manera subsecuente es cortado por la γ -secretasa, produciendo un péptido pequeño no amiloidogénico denominado p3 de 3 kDa. El procesamiento de la APP por la α -secretasa ocurre dentro de la región del A β , y por lo tanto excluye la formación de A $\beta_{1-40/42}$ (Bar-Am et al., 2005, LaFerla et al., 2007) (Ver figura 2).

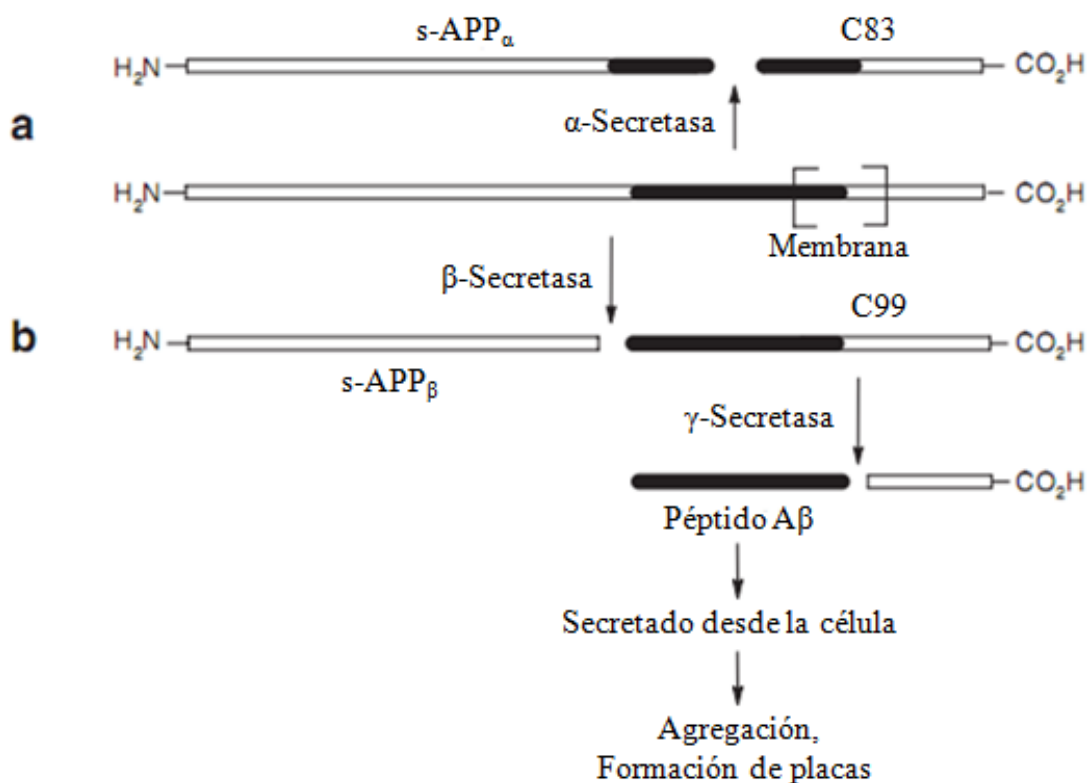


Figura 2. Proteólisis de la proteína precursora de amiloide (APP). a) vía no amiloidogénica de la APP; b) vía amiloidogénica de la APP producto del mecanismo de dos complejos enzimáticos: β -y γ -secretasas, dando como resultado la síntesis del péptido A β (Modificado de Carter et al., 2010).

2.3.1.2 Vía amiloidogénica

Esta vía se caracteriza por la proteólisis inicial que se lleva a cabo por la actividad de la β -secretasa y da como resultado la liberación del fragmento sAPP β al espacio extracelular y produce un fragmento transmembranar de 99 aminoácidos (C99). De manera subsecuente la proteólisis de este fragmento transmembranar ocurre entre los

residuos 38 y 43 por la γ -secretasa y libera el péptido $A\beta_{1-40/42}$ (LaFerla et al., 2007). El complejo PS- γ -secretasa puede cortar la APP, la variante que más predomina es la de 40 aminoácidos ($A\beta_{1-40}$), y una pequeña porción (aproximadamente 10%) es de la variante de 42 aminoácidos ($A\beta_{1-42}$), la cual es más hidrofóbica y más propensa a la formación fibrilar, por lo que es predominante en las placas seniles (Younkin, 1998, Plant et al., 2003, LaFerla et al., 2007) (Ver figura 2). Se ha demostrado que la sobreexpresión de APP incrementa la formación de péptidos amiloidogénicos en cultivos celulares y causa neurodegeneración y disfunción cognitiva en ratones transgénicos (Bar-Am et al., 2005). La APP también se encontró en forma circulante en fluidos extracelulares, incluyendo el líquido cefalorraquídeo y el plasma (Haass y Selkoe, 2007).

2.3.2 Mutaciones que afectan la producción de la $A\beta$

Las causas genéticas que se han establecido en la EA autosomal dominante incluyen mutaciones en genes dominantes que codifican para la *APP*, *PSEN1* y *PSEN2*, las dos últimas ocasionan un aumento en la producción de $A\beta_{1-42}$ porque las proteínas de presinilinas forman parte del complejo enzimático de γ -secretasa, el cual corta el APP para producir la $A\beta$ (Martins et al., 1995). Así, se sabe que estos genes son esenciales para el estudio de los mecanismos moleculares de esta enfermedad, ya que tienden a manifestarse como una patogénesis de inicio temprano, afectando el metabolismo y la estabilidad de la $A\beta$ (St George-Hyslop y Petit, 2005; Rogaeva et al., 2007).

En el caso de la EA de tipo esporádico, se ha identificado al gen *SORL1* como un dominio genético importante en la manifestación de la patología. Por otro lado, individuos con dos alelos de *ApoE* $\epsilon 4$ son más susceptibles de padecer la EA en comparación de los individuos que tienen dos alelos *APOE* $\epsilon 3$ (Corder et al., 1993; Rogaeva et al., 2007). Gracias al estudio de estas mutaciones, han permitido generar ratones transgénicos para el estudio de la EA. Una mutación común en la APP es la conocida como Swedish (APP_{Swe}) la cual es un cambio de aminoácidos que conduce a un incremento en la proteólisis de esta proteína por la β -secretasa. Otras mutaciones, como Arctic (APP_{Arc}) tienen un efecto para incrementar la agregación de la $A\beta$. Las

mutaciones en las presenilinas, como la mutación PS1_{M146V}, incrementa los niveles de A β ₁₋₄₂ (Jankowsky et al., 2004).

2.3.3 Agregados amiloides

Los agregados de amiloide son depósitos de fibrillas y agregados amorfos del péptido de A β extracelular (Mattson, 2004) e intracelular, encontrado recientemente en neuronas del cerebelo y médula espinal de personas entre 38 a 83 años (LaFerla et al., 2007), lo que sugiere que la síntesis de la A β intracelular es un evento que no es dependiente de la edad. También se ha propuesto que la formación de la A β intracelular sea un evento temprano que precede a la formación extracelular de los depósitos de la A β en la patogénesis de la EA y el síndrome de Down (Gyure et al., 2001), además se ha demostrado que los niveles de la A β intraneuronal disminuyen conforme se acumulan los agregados de amiloide. El péptido A β puede existir en diferentes estados físicos y compartimientos (por ejemplo: monomérico, oligomérico o fibrilar; intracelular o extracelular). Sin embargo, aún se desconoce cuál estado de la A β es el patológicamente responsable. Es posible que todas las formas ejerzan alguna actividad específica durante las etapas diferentes del proceso de la enfermedad (Mandelkow et al., 2003).

2.3.4 Hipótesis de la cascada amiloide

Esta hipótesis plantea que la acumulación y agregación del péptido de A β desencadena una cascada lenta y potente que activa a la microglía y a los astrocitos, modifica la proteína tau en las neuronas e induce la formación de filamentos helicoidales, así como una pérdida neuronal progresiva asociada con múltiples deficiencias de neurotransmisores y daño cognitivo (Haass y Selkoe, 2007). Dado esto, se ha propuesto un modelo que pretende explicar el proceso de la enfermedad conocido como “hipótesis de la cascada amiloide” (Ver figura 3). En esta hipótesis se admite la existencia de dos factores de riesgo para el desarrollo de la enfermedad, ligados a la edad y a alteraciones en los genes PS1, PS2 y APP, siendo la edad el factor principal.

Por otra parte, existe un gran número de estudios *post-mortem* de la EA en personas que padecieron el síndrome de Down y en ratones transgénicos para la EA que aportan evidencia de la presencia de la A β intracelular en las neuronas. También se cuenta con evidencias de que las dos formas de la A β que predominan en la EA son los fragmentos A β_{1-40} y A β_{1-42} . Este péptido que tiene un peso molecular de alrededor de 4 kDa, adopta una configuración de β -plegada y tiende a formar fibrillas que al agregarse forman depósitos de tipo amiloide. Aunado al uso de anticuerpos contra la región C-terminal del péptido A β , se ha observado que el más abundante es el A β_{1-42} . (Takahashi et al., 2002).

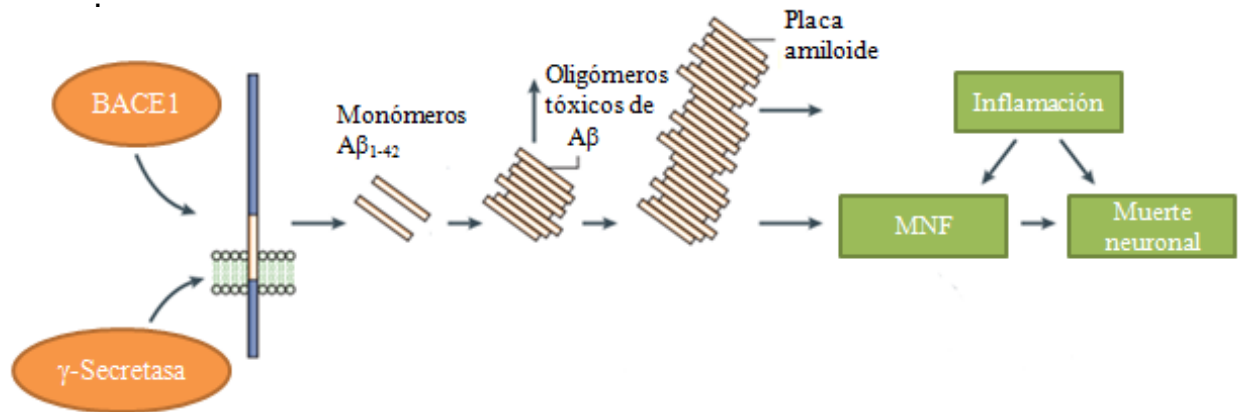


Figura 3. Hipótesis de la cascada amiloide. En esta figura se esquematiza la hipótesis de la cascada amiloide la cual inicia desde la síntesis de A β que surge de la proteólisis de una proteína conocida como precursora amiloide en la cual participan dos proteasas: β -Secretasa (también conocido como BACE1) y γ -Secretasa, los cuales sintetizan las distintas variantes del A β , siendo el más común el de 42 aminoácidos de longitud. Posterior a su síntesis, el A β tiende a oligomerizarse hasta formar conglomerados tóxicos conocidos como placas amiloides. La hipótesis propone que de la formación de estas placas se originan las marañas neurofibrilares (MNFs) las cuales al interactuar, dan como resultado: neuroinflamación y muerte neuronal (Adaptado de Citron 2010).

En lo que respecta a las MNFs, se ha descrito que no son únicas en la EA, sino que también se acumulan en otras enfermedades neurodegenerativas, incluyendo la demencia frontotemporal con parkinsonismo ligado al cromosoma 17 (FTDP-17), la enfermedad neurodegenerativa de Pick, la parálisis supranuclear progresiva y la degeneración corticobasal. El principal componente de las marañas es la presencia de la proteína tau asociada a los microtúbulos que en su estado normal, es una proteína soluble que promueve el ensamblaje de los microtúbulos y su estabilización. Las formas

patológicas de la proteína tau anormalmente fosforilada en determinados residuos reduce notablemente su afinidad por los microtúbulos. Aún no se ha establecido cómo el mal plegamiento de tau causa la toxicidad celular, sin embargo el transporte axonal ha despertado un gran interés ya que los estudios sugieren que la proteína tau hiperfosforilada impide el transporte axonal por interferir con las proteínas motoras, antes de la formación de las marañas (Mandelkow et al., 2003). (Ver figura 4).

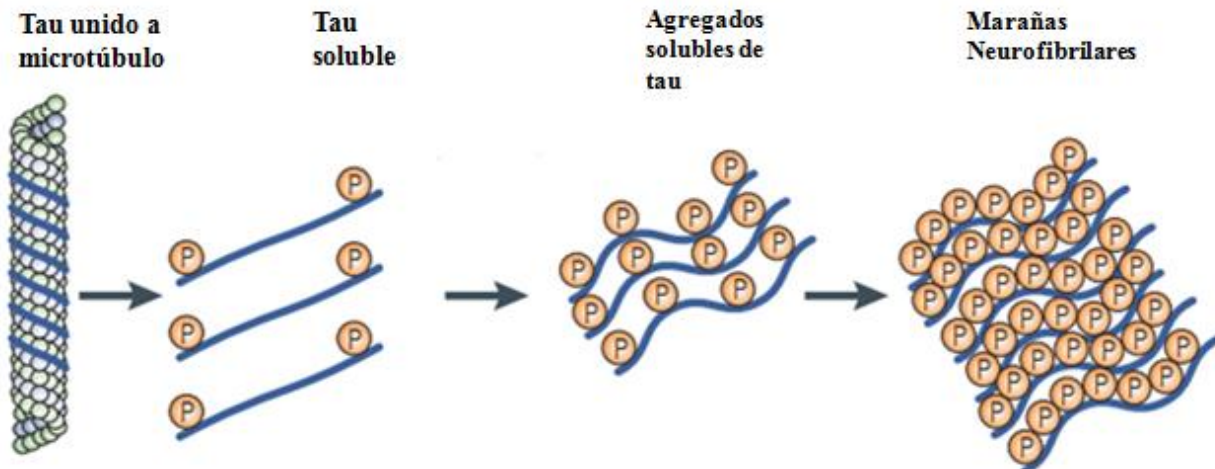


Figura 4. Patología de la tau. La proteína tau unida a los microtúbulos interviene en el transporte axonal. En la EA, tau es hiperfosforilada lo cual, podría ocasionar la separación de tau de los microtúbulos, y a su vez, podría generar la formación de filamentos helicoidales pareados de agregados de tau solubles e insolubles quienes finalmente formarán a las marañas neurofibrilares (Modificado de Citron 2010).

2.4 Alteraciones macroscópicas de la EA

Las alteraciones macroscópicas de la enfermedad se caracterizan por atrofia, que generalmente es simétrica y difusa de los giros cerebrales, que se evidencia en la disminución del espesor de las circunvoluciones, aumento en la profundidad de los surcos, dilatación del sistema ventricular y disminución del peso y volumen cerebral (Girones et al., 2002). Los lóbulos temporal y frontal, que están relacionados con los procesos de memoria y aprendizaje, se encuentran reducidos en tamaño en un paciente con la EA como resultado de sinapsis degeneradas y muerte neuronal (Mattson, 2004), sin embargo, también se han descrito lesiones en menor medida en los lóbulos parietales y occipitales. El patrón de atrofia más común es el difuso, seguido por una combinación de atrofia fronto-temporal, frontal o temporal aisladas, y en menor proporción puede haber una relación de daño parieto-occipital. Los análisis de

neuroimagen de los hemisferios cerebrales de los pacientes con Alzheimer revelan un adelgazamiento de la lámina cortical y una dilatación simétrica del sistema ventricular (hidrocéfalo exvacuo). Los ganglios basales, el diencefalo, el mesencéfalo y el tronco cerebral no muestran anomalías notables (Girones et al., 2002) (Ver figura 5).

También se ha observado que los pacientes presentan degeneración de nervios ópticos y de células ganglionares en la retina, por lo que tienen dificultad de transmitir la información fótica (Katz et al., 1989), así como presentar anomalías en el ritmo circádico del ciclo sueño-vigilia lo cual, puede ser también una herramienta importante en el diagnóstico temprano de la EA (Petit et al., 2004).

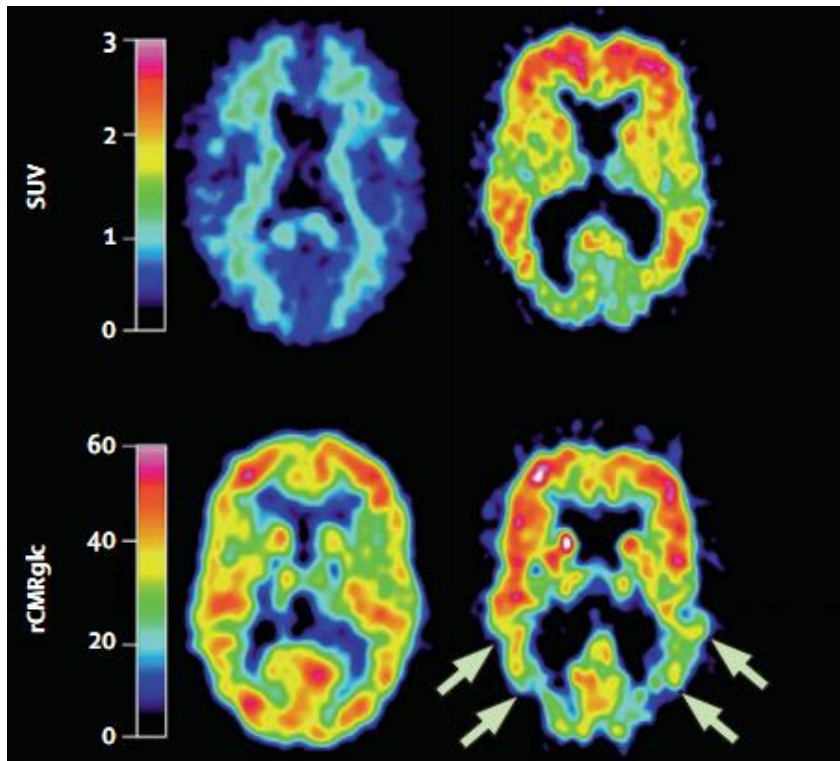


Figura 5. Neuroimagen de un paciente con EA y una persona sana. Arriba: Carbono 11 marcado con PIB (Compuesto Pittsburgh B) estandarizado en el cerebro de una persona sana de 67 años (izquierda) y en un paciente de 79 años de edad con EA (derecha) para observar acumulación de péptido A β . Abajo: 18 F-fluorodeoxiglucosa para analizar el metabolismo de la glucosa cerebral ($\mu\text{mol}/\text{min}/100 \text{ mL}$). Se observa una alta retención de PIB en la corteza frontal y temporoparietal en el paciente con EA además de hipometabolismo de la glucosa cerebral. En la persona sana hubo ausencia de retención de PIB (superior izquierda) y metabolismo de glucosa normal (inferior izquierda). (Reproducido de Nordberg 2004).

2.5 Tratamiento de la EA

Desde 1984 se ha producido de manera ininterrumpida un avance prodigioso en el conocimiento de la patología química de la EA, tal como la composición subunitaria de las placas seniles y las MNFs, y sobre todo de la genética molecular de la EA, lo cual ha determinado el grado de importancia que cada proteína tiene en el desarrollo de la patología. Estos estudios han permitido un conocimiento farmacológico para desarrollar drogas que pudieran ser utilizadas terapéuticamente como por ejemplo reduciendo la carga del péptido de A β . Una de esas aproximaciones fue identificar las enzimas β - y γ -secretasas para interferir la producción de A β . Sin embargo, se han detectado efectos contraproducentes ya que se ha demostrado que la pérdida de A β endógeno por inhibición farmacológica resulta en una severa reducción en la viabilidad de las neuronas (Plant et al., 2003). Otros grupos han propuesto que el fármaco Rasagilina y sus derivados inducen, al igual que la droga anti-Alzheimer ladostigil (TV3326), el aumento de sAPP α no amiloidogénico (Bar-Am et al., 2005), evitando así la neurotoxicidad por la sobreproducción de A β .

La enzima degradadora de insulina (IDE) es una tiol-metalo-endopeptidasa de ~110kDa que degrada péptidos pequeños como la insulina y el péptido A β , siendo identificada como la proteasa más importante en la degradación de agregados extracelulares. La sobreexpresión neuronal de IDE reduce los niveles de A β y retarda la formación de placas. IDE degrada exclusivamente las especies monoméricas del péptido A β (Caccamo et al., 2005).

La presencia de neprilisina en los sitios presinápticos tiene una importancia característica, porque es capaz de degradar las formas monoméricas y oligoméricas del péptido de A β . La sobreexpresión de neprilisina repercute en la reducción de los niveles de A β , además de que la administración de inhibidores de neprilisina en ratones transgénicos eleva los niveles de A β en el cerebro. En estudios con cerebros de humano *post mortem*, los niveles de RNAm de neprilisina fueron bajos en regiones vulnerables en el desarrollo de placas seniles como el hipocampo y el giro mediotemporal (Yasojima et al., 2001, Hellstrom-Lindahl et al., 2008).

Nilsen ha sugerido que un modo de prevención resulta de la exposición de estrógenos, ya que puede prevenir la neurotoxicidad por A β *in vitro* e *in vivo*. Muchos de los efectos inmediatos en el tratamiento de estrógenos convergen en la neuroprotección de la mitocondria, mediante la regulación homeostática del calcio (Nilsen et al., 2006).

En la figura 6 se enlistan los objetivos terapéuticos propuestos por distintos grupos de investigadores con el fin de disminuir los síntomas característicos de la EA, lo cuales, de manera general sugieren la eliminación de los agregados de A β y de MNFs.

Inhibidores de la agregación de A β	<ul style="list-style-type: none"> • Moléculas antiagregantes no peptídicas (sintéticas o naturales)
Inhibidores de la producción de A β	<ul style="list-style-type: none"> • Inhibidores de β-secretasa • Inhibidores de γ-secretasa • Moduladores de γ-secretasa • Activadores de α-secretasa
Inhibidores de los efectos neurotóxicos inducidos por A β	<ul style="list-style-type: none"> • Agentes anti-inflamatorios • Agentes antioxidantes
Inhibidores de los efectos neurotransmisores inducidos por A β	<ul style="list-style-type: none"> • Inhibidores de la enzima colinesterasa • Antagonistas de N-metil-D-aspartato
Inhibidores de la neurotoxicidad inducida por tau	<ul style="list-style-type: none"> • Antiagregantes de tau

Figura 6. Terapias para combatir la EA. Se enlistan las distintas estrategias terapéuticas que han sido estudiados por diversos grupos de científicos. (Carter et al., 2010).

Por otro lado, se ha sugerido que en las mujeres la prescripción de tratamiento a estrógenos alrededor de la menopausia, ha sido asociado con una mayor respuesta en los sistemas de neurotransmisores, los cuales son fundamentales en la memoria y por ende se plantea como otra estrategia para atenuar los efectos de la EA (Craig y Murphy, 2010).

El uso de Anti Inflamatorios No Esteroideos (AINES), inhibidores de acetilcolinesterasa, y el uso de medicamentos antioxidantes han sido también

tratamientos utilizados en la EA. Se ha reportado que la administración de altas dosis de AINES reduce la agregación de amiloide en ratones APP transgénicos, ya que tiene un efecto modulador sobre la actividad de la γ -secretasa impidiendo la formación de $A\beta_{1-42}$ y con esto, disminuye el progreso de la enfermedad (Wolfe 2002; Citron 2004).

Por otra parte se ha propuesto que el estrés oxidativo es uno de los primeros cambios bioquímicos que conduce a la disfunción y posterior muerte neuronal en la EA, debido a una excesiva producción de radicales libres y especies reactivas que no pueden ser contrarrestados por una serie de sistemas antioxidantes. La presencia de estrés oxidativo se debe a un exceso de producción de sustancias pro-oxidantes y/o al déficit de mecanismos de defensa contra la oxidación (Halliwell, 1992). Por ello, el anti-oxidante R-alfa ácido lipoico (AL) se ha propuesto como un terapéutico que podría actuar incrementando la producción de acetilcolina o como quelante de metales o incluso evitando la acumulación de productos de lipoperoxidación. El AL se ha utilizado como terapia para reducir los efectos del estrés oxidativo en ratones transgénicos $A\beta$ PP (Siedlak et al., 2009) y también para retardar el deterioro de la memoria hipocampal en el ratón transgénico Tg2576 (Quinn et al., 2007, Maczurek et al., 2008). Por otra parte, el AL también ha sido usado en conjunto con la acetil carnitina como protector de células neuronales *in vivo*. La capacidad antioxidante del AL y su forma de reducirse a ácido dihidrolipoico se ha demostrado que atenúa la deficiencia de vitamina E en el modelo de ratón transgénico, lo cual han mostrado que con la administración crónica de AL disminuye la expresión de proteínas y marcadores de la peroxidación lipídica en cerebros controles y transgénicos para la $A\beta$ PP (Tg2576), sin embargo en éste no se demostró cambios en los niveles de la proteína de $A\beta$., además que los cambios conductuales documentados para este tipo de modelo transgénico no están asociados a la cantidad de $A\beta$ (Smith et al., 2000).

El estrés oxidativo en el SNC se manifiesta predominantemente como peroxidación lipídica por su gran contenido de ácidos grasos poli-insaturados que particularmente son susceptibles a la oxidación. Los F2-isoprostanos (F_2 -iPs) son marcadores específicos y sensitivos *in vivo* de la peroxidación lipídica. En ratones transgénicos se ha observado que la peroxidación lipídica precede a la formación de las

placas amiloideas (Pratico et al., 2001), y en cultivos celulares de corteza cerebral se ha demostrado que la producción de especies tóxicas de A β junto con los procesos de gliación de la proteína tau inducen estrés oxidativo (Yan et al., 1995, Butterfield et al., 2002).

Lo más novedoso con relación a nuevas terapias para combatir la EA es el avance de la inmunoterapia. En el modelo de la EA en ratones transgénicos, la vacunación con la A β produjo anticuerpos anti-A β y una notable disminución del número de placas seniles en el cerebro (Schenk et al., 1999, Vasilevko y Cribbs, 2006). Los ratones transgénicos vacunados mostraron mejoría en pruebas de memoria (Morgan et al., 2000). Posteriormente se inició la inmunización en humanos con el compuesto AN1792, que consistía en A β ₁₋₄₂ fibrilar como inmunógeno y de un coadyuvante QS21, sin embargo se suspendió su administración ya que los pacientes presentaron meningoencefalitis (Hock et al., 2003).

2.6 Diagnóstico de la EA

Uno de los principales objetivos de los investigadores de la EA durante el último cuarto de siglo ha sido el identificar su etiología y los mecanismos moleculares para ser capaces de diseñar fármacos que inhiban temprana y satisfactoriamente su mecanismo fisiopatológico.

El diagnóstico *in vivo* se caracteriza por una serie de exámenes de laboratorio y de imágenes por resonancia que permiten descartar causas reversibles de demencia, así como pruebas neuropsicológicas que demuestren la presencia de algún deterioro cognitivo no debido a una depresión. Ejemplos de estos pueden ser el United States National Institute for Communicative Disorders and Stroke y The Alzheimer's Disease and Related Disorders Association (NINCDS-ADRDA). Por otro lado, existen otros tipos de criterios que son evaluados por el CERAD por su nombre en inglés Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease el cual realiza evaluaciones clínicas, neuropsicológicas, neuropatológicas, de comportamiento y de historia familiar en la EA, y que se diferencia bien entre las personas normales y los pacientes con demencia leve a moderada (Fillenbaum et al., 2008).

Otro diagnóstico que parece prometedor entre las diversas investigaciones en imágenes, son los estudios de visualización de amiloide *in vivo*. Recientemente se reportó los resultados de visualización de amiloide en pacientes con la EA, usando un compuesto llamado compuesto PIB (Pittsburg Compound B), el cual interactúa con el A β y, al ser radioactivo, es visible por tomografía de emisión de positrones (PET) (Klunk et al., 2004); en experimentos utilizando ratas se puede visualizar por resonancia magnética (Higuchi et al., 2005) el uso combinado de mediciones en el líquido cefalorraquídeo de tau y de A β ₁₋₄₂, y acompañado de la detección de amiloide con PIB, puede llegar a ser un examen de diagnóstico efectivo para la EA (Behrens y Vergara, 2007). La combinación de estas pruebas puede diagnosticar a un probable enfermo. Sin embargo, las pruebas olfatorias no invasivas y bien diseñadas pudieran evaluar la capacidad de identificar, discriminar y recordar entre una batería de olores volátiles y de olores con relevancia para la reproducción.

2.7 El sistema olfatorio en mamíferos

Las neuronas sensoriales olfatorias se encargan de detectar una gran variedad de moléculas de olor y envían la información a través de sus axones hacia el bulbo olfatorio, que es el primer sitio para el procesamiento de la información olfatoria en el cerebro (Mori et al., 1999). La vía olfatoria es muy específica y organizada que permite recibir señales en más de 1000 receptores diferentes los cuales se localizan en la superficie membranal del epitelio olfatorio y se integran en 1800 glomérulos en el bulbo olfatorio del ratón (Reed, 1992; Axel, 1995). Debido a los avances recientes, se ha propuesto al bulbo olfatorio principal (BOP) como la primera estación de información molecular de relevo en el sistema olfatorio. El BOP de mamíferos tiene una estructura cortical la cual contiene miles de módulos organizados como glomérulos de forma esférica a los que llegan los axones de las neuronas sensoriales olfatorias y forman conexiones sinápticas con las dendritas de las células mitrales y las células en penacho que son las neuronas de salida del BOP (Reed, 1992). (Ver figura 7)

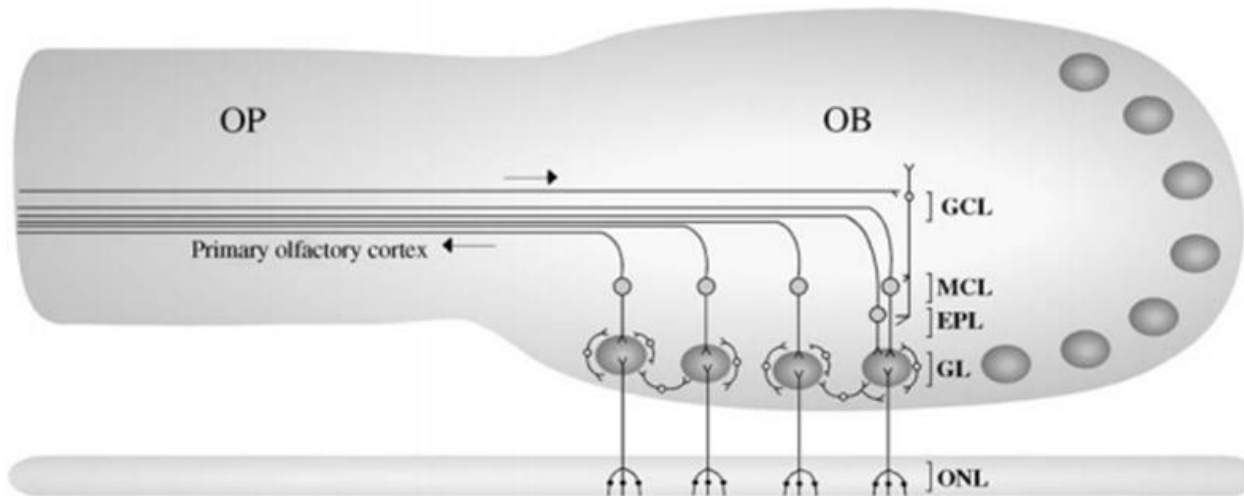


Figura 7. Esquema sagital del bulbo olfatorio humano. En esta figura se esquematiza el flujo de la información desde las neuronas receptoras olfatorias hasta su relevo en las distintas capas del bulbo olfatorio principal. OP= pedúnculo olfatorio OB= bulbo olfatorio GCL= capa de células granulares MCL= capa de células mitrales EPL= capa plexiforme externa GL= capa glomerular ONL= capa del nervio olfatorio. (Reproducido de Bédard y Parent, 2004).

2.8 Vía olfatoria

Se han descrito dos órganos en los vertebrados terrestres responsables de la detección de sustancias químicas del entorno, el epitelio olfatorio (EO) y el órgano vomeronasal (OVN) u órgano de Jacobson (Halpern y Martínez-Marcos, 2003). El EO y el OVN proyectan a regiones distintas del bulbo olfatorio, conocidas respectivamente como el bulbo olfatorio principal (BOP) y accesorio (BOA) (Scalia et al., 1991). En los mamíferos, la información sensorial desde el órgano del EO, se proyecta a través del tracto olfatorio el cual está constituido por los axones de las células mitrales y empenachadas las cuales circulan de manera superficial desde la base del BOP, pasando por la parte trasera del lóbulo temporal y luego por el borde anterior de la ínsula, alcanzando el uncus del lóbulo temporal (Ver figura 8), el relieve superficial del tracto se conoce como cintilla olfatoria lateral, que es la capa más superficial que junto con las áreas allocorticales subyacentes forman la corteza olfatoria secundaria dividida en área prepiriforme que se extiende bajo el tracto olfatorio en su recorrido por el lóbulo frontal y el borde anterior de la ínsula y la posterior piriforme la cual cubre a la amígdala. La información olfatoria sigue un trayecto neural después del BOP, pasando por diferentes regiones cerebrales como el núcleo o área olfatoria anterior, tubérculo

olfatorio, corteza piriforme y entorrinal, hasta llegar a la amígdala y se continúa con proyecciones al hipocampo y a la corteza frontal a través del tálamo mediodorsal (Martínez-García et al., 2011). Por otra parte, el BOA proyecta exclusivamente a la amígdala cortical posteromedial y a dos estructuras de la amígdala subcortical, la amígdala medial y el núcleo de lecho de la estría terminal, siendo el hipotálamo el último relevo de la información olfatoria y se encarga del control neuroendócrino y de la producción de hormonas gonadales como el estradiol, la progesterona y la testosterona. Lo anterior debido a que el BOA recibe señales de olores sexualmente relevantes (odorantes conocidos como feromonas), que al ser inhalados generan un cambio conductual (Buck, 2000), función opuesta al BOP, el cual detecta odorantes volátiles sexualmente irrelevantes. Por lo tanto, ambos sistemas (el BOA y el BOP) procesan diferentes aspectos de la información olfatoria (Ver figura 9).

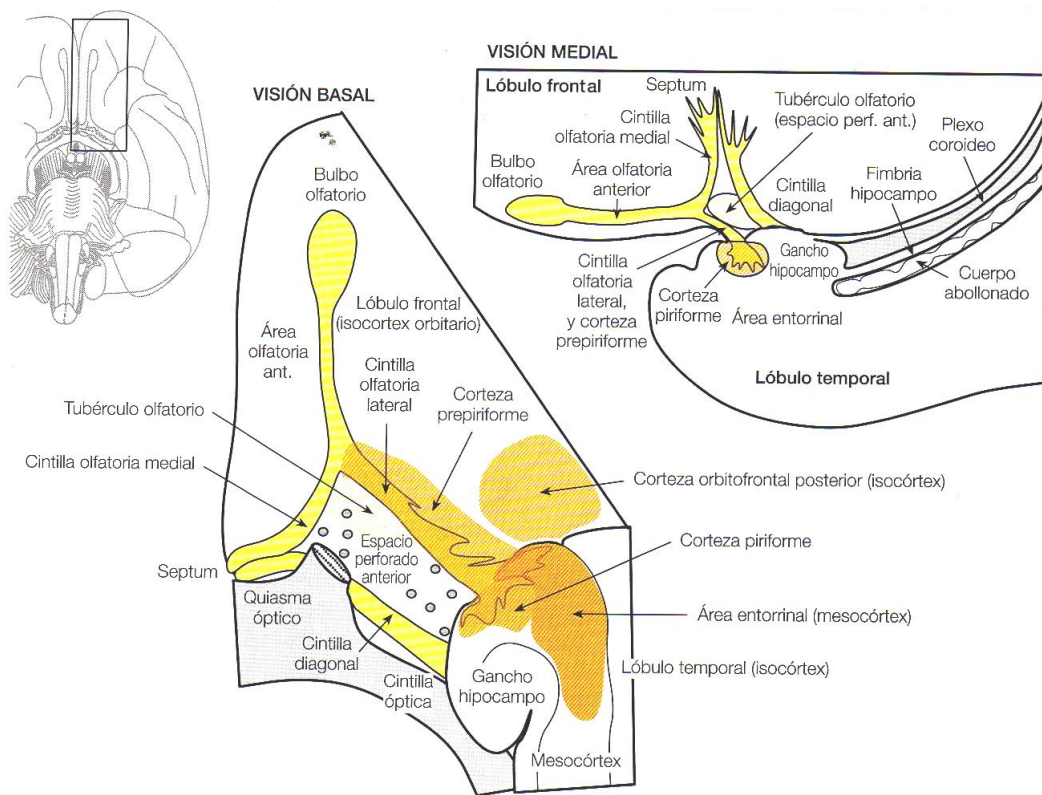


Figura 8. Áreas alo-corticales olfatorias. Planos basal y medial (modificado de Puelles et al., 2004, cap 29).

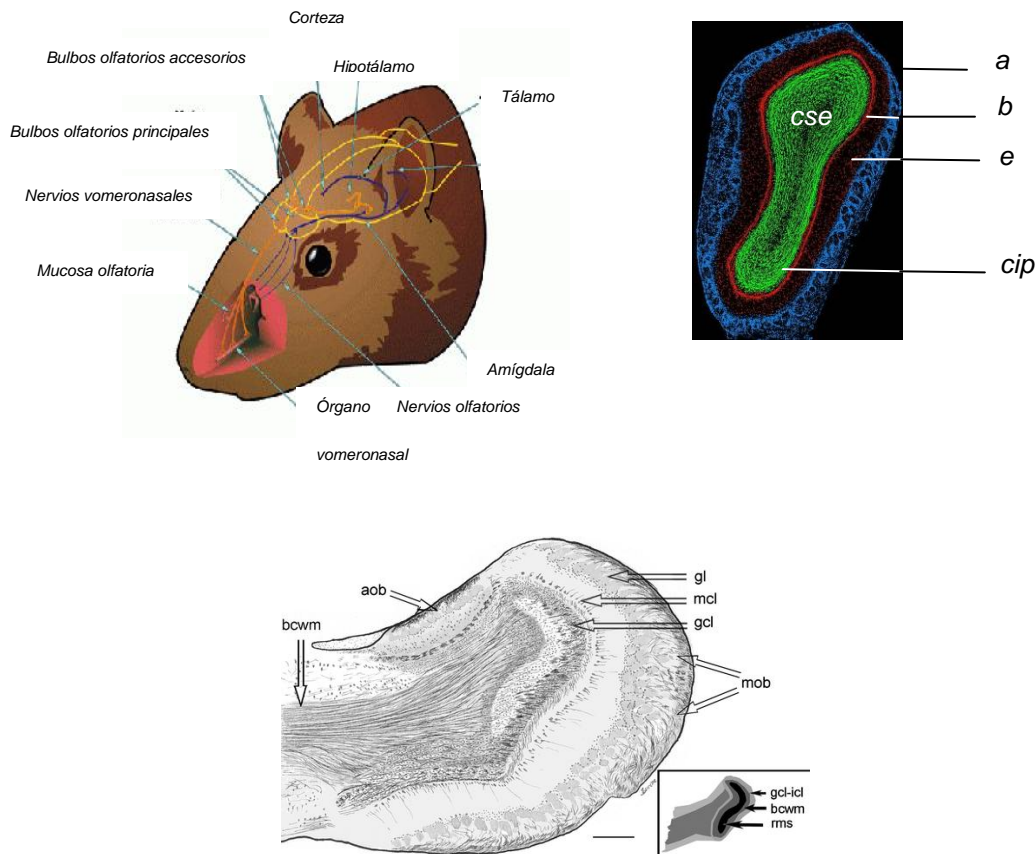


Figura 9. Sistema olfatorio en roedores. En A, nótese el tamaño de los bulbos olfatorios principales y accesorios, así como las vía de proyección al SNC del órgano vomeronasal (líneas naranjas) y de la olfacción (líneas azules) hacia estructuras límbicas (hipotálamo, tálamo, hipocampo y amígdala). En B, corte transversal del bulbo olfatorio, con la capa glomerular (a); la de células mitrales (b) y granulares (e) y las capas plexiforme interna (cip) y subependimal (cse) (Tomado de <http://i121photoalbumbucket.com>). Abajo, un dibujo de una sección longitudinal del bulbo olfatorio (BO) de la rata adulta: el BO accesorio (aob), principal (mob), y la sustancia blanca del núcleo bulbar (bcwm), nótese: las relaciones la bcwm con el flujo migratorio rostral subyacente (rms) y con la corteza bulbar circundante, es decir, con las capas granular (gcl) y la celular interna (icl) del accesorio y con las principales capas: glomerular (gl), de células mitrales (mcl) y granular (lg) del principal. Técnica de impregnación argéntica de Cajal. Inserto indica la localización de las capas del bulbo olfatorio. Barra 200 μ m (Modificado de Paredes y Larriva-Shad, 2010).

En determinados contextos la información olfatoria desencadena reacciones potentes emocionales de agrado o desagrado, aversión y pulsión teniendo tendencia a quedar grabado en la memoria, de manera inconsciente. Un olor sencillo puede desencadenar un recuerdo de una escena compleja de nuestra vida anterior. Estos efectos resultan de la conectividad directa de la corteza piriforme, que cubre la amígdala sobre sus núcleos paliales, que integran la memoria emocional y sobre las cortezas entorrinal y parahipocampal, lo que facilita la entrada al hipocampo y en

consecuencia, la experiencia olfatoria es grabada en la memoria junto con los detalles de la experiencia (contexto vivencial) (Shepherd, 1994).

2.9 Alteraciones en el sistema olfatorio en la EA

A pesar de que la EA fue caracterizada en 1906 por el Dr. Alois Alzheimer, no es hasta la década de los 80's cuando se describió por primera vez la disminución en la capacidad olfatoria en los pacientes con probable EA. Los primeros trabajos sobre la pérdida de la olfacción en la EA datan de los trabajos de Averbach en 1983 y de Esiri y Wilcock en 1984, quienes reportaron una pérdida neuronal considerable, la presencia de placas seniles y la formación de MNFs en el núcleo olfatorio anterior (Averbach, 1983, Esiri y Wilcock, 1984), así como también una deficiencia en el sistema colinérgico en los tubérculos olfatorios observados en estudios *post-mortem* de cerebros humanos que presentaron la EA (Simpson et al., 1984). En un trabajo de pacientes enfermos con la EA, el grupo de Warner, propuso que el deterioro olfatorio es un síntoma temprano en la EA y que se asocia a problemas serios como la disminución de apetito, lo cual repercute en la pérdida de peso y en un estado nutricional pobre, además de la incapacidad de detectar olores nocivos para la salud como el gas y el humo (Warner et al., 1986) (Ver figura 10). La pérdida en la capacidad de discriminar olores no es exclusiva de la EA, también se presenta en la enfermedad de Parkinson, la esclerosis múltiple y asociada a otros problemas endócrinos, así como también a infecciones virales, a lesiones cerebrales y al envejecimiento (Richard et al., 2010). También se ha demostrado una reducción en la capacidad olfatoria similar a la EA en ancianos esquizofrénicos (Moberg, et al., 1997), en el impedimento cognitivo leve (Wang, et al., 2002) y en la demencia frontotemporal (McLaughlin y Westervelt, 2007). Sin embargo en la EA, la pérdida en la discriminación olfatoria es un cambio temprano en la enfermedad que se acompaña con el progresivo deterioro cognitivo.

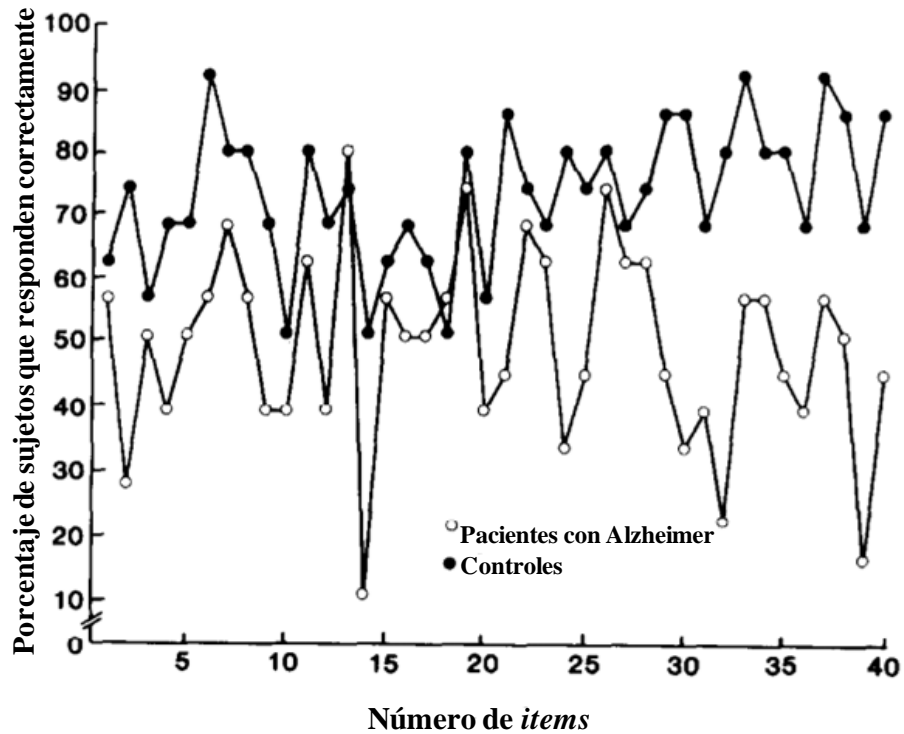


Figura 10. Resultados de la prueba de identificación de olores. En esta gráfica se muestran los resultados de la prueba de identificación de olores en donde se comparan personas sanas contra pacientes de EA (Modificado de Warner et al., 1986).

Posteriormente se observó la presencia de placas amiloides y MNF en bulbos olfatorios y en el tracto olfatorio de cortes de tejido *post-mortem* de cerebros de humanos con EA (Mann et al., 1988) (Ver figura 11).

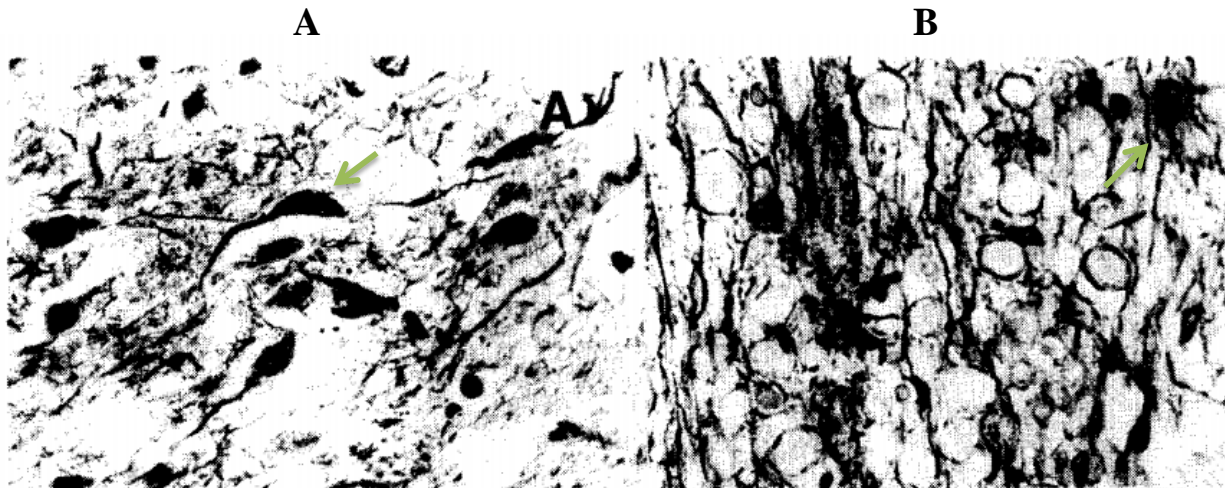


Figura 11. Bulbo olfatorio de una paciente de 83 años de edad con EA. En A se muestran las MNF y en B los agregados de amiloide en el bulbo olfatorio (Reproducido de Mann, 1988).

Años más tarde, el grupo de Loopuijt reportó en 1990 un decremento de receptores a dopamina en la capa glomerular y también una disminución de células mitrales en el bulbo olfatorio principal, además de la presencia de MNFs en todas las capas del bulbo olfatorio principal, lo cual concordaba con los trabajos de Talamo quien observó MNFs en las neuronas del epitelio olfatorio indicando el daño que estas células presentaban en los enfermos con la EA (Talamo et al., 1989, Loopuijt et al. 1990).

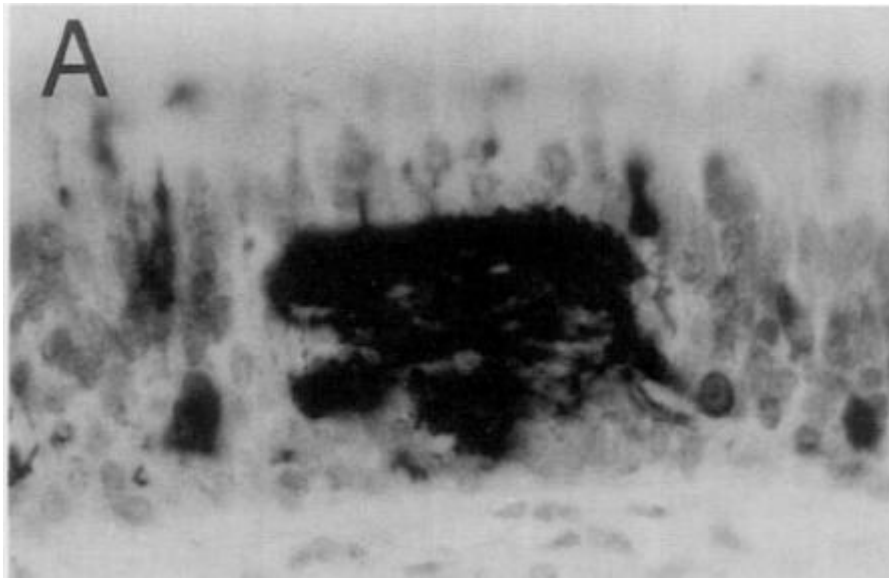


Figura 12. Epitelio olfatorio de un enfermo de EA. En este tejido se aprecia la presencia de filamentos helicoidales pareados (Reproducido de Lee, et al. 1993).

Por otra parte Selden identificó MNFs y placas de A β en el tubérculo olfatorio, así como en el núcleo accumbens y en el tallo del núcleo caudado, estos datos sugerían que el sistema límbico es más vulnerable en la EA (Selden et al. 1994).

En otro estudio, se evaluó la acumulación de elementos dañinos conocidos como neurotoxinas (ej.: aluminio, bromo, hierro y mercurio) los cuales se encontraron en cantidades elevadas en cerebros con EA comparados con cerebros controles, lo cual llevó a Samudralwar (1995) a evaluar la cantidad de estos elementos presentes en la vía olfatoria, y pudo comprobar que había cantidades aumentadas de hierro y zinc, además de un decremento de bromo en el sistema olfatorio comparados con cerebros de sujetos sanos, proponiendo que las concentraciones elevadas de hierro tendrían un

papel muy importante en la inducción del estrés oxidativo característico de esta neuropatología (Samudralwar et al., 1995).

En el sistema olfatorio se ha encontrado también que la síntesis de la A β se debe a la proteólisis de la APP, por lo que se ha evaluado la aparición cronológica de la APP. Así, Clarris en 1995 describió cronológicamente la aparición de la APP de la rata desde el día embrionario 16 (E16) hasta el postnatal 8 (P8), en donde también hay un aumento de las neuronas sensoriales primarias. La APP también se detectó en la capa de las células mitrales en el día E18 cuando se llevan a cabo las primeras sinapsis entre las dendritas de estas células y los axones de las células sensoriales primarias. Estos datos sugirieron que la expresión de la APP en el sistema olfatorio es regulada en coordinación con grandes periodos de sinaptogénesis, lo cual se propone que juega un papel importante en la regulación terminal del crecimiento axonal durante la sinaptogénesis en el bulbo olfatorio. (Clarris et al., 1995) (Ver figura 13).

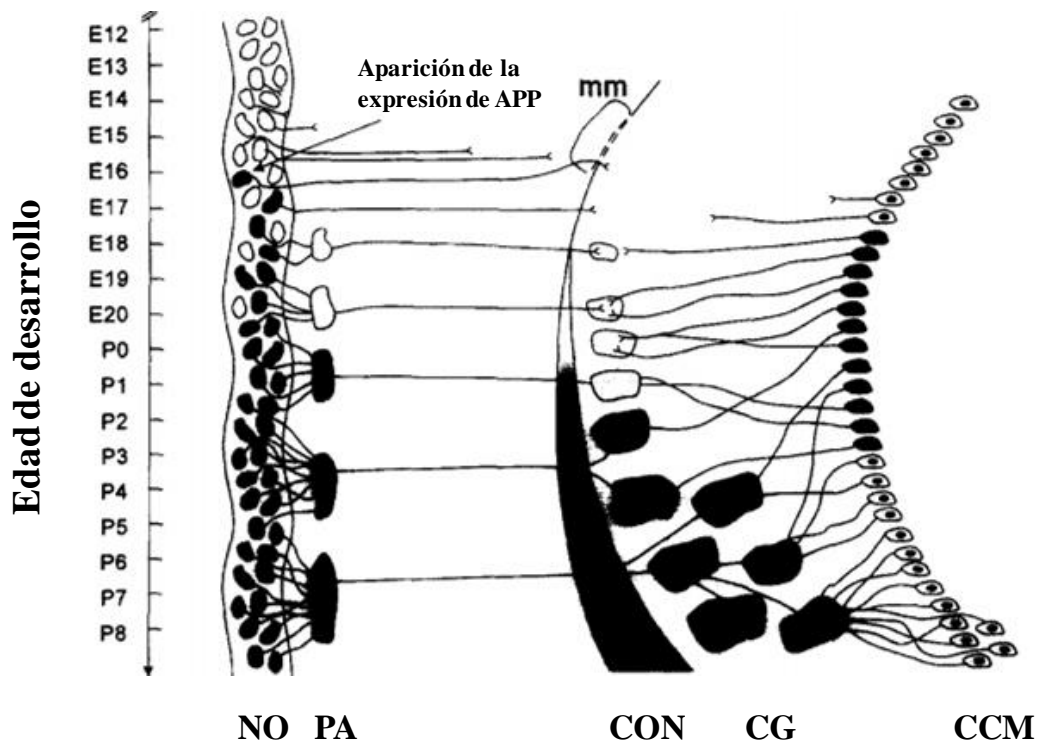


Figura 13. Diagrama que representa la expresión temporal y espacial de la APP en el desarrollo del sistema olfatorio de la rata. NO= neuroepitelio olfatorio; PA= pedúnculo axonal; CON= capa nerviosa olfatoria CG= capa glomerular; CCM= capa de células mitrales; mm= masa migratoria (Adaptado de Clarris et al., 1995).

La APP parecía entonces tener un papel muy importante en la formación o en el mantenimiento de las conexiones sinápticas entre axones de células olfatorias y las dendritas terminales de las células mitrales, porque la APP se incrementa en el epitelio olfatorio conforme aumenta la edad.

Por otra parte, Kulkarni-Narla en 1996 dio a conocer que el estrés oxidativo es un factor contribuyente en los cambios neurodegenerativos en la mucosa olfatoria en humanos con EA (Kulkarni-Narla et al., 1996), y posteriormente se detectó estrés oxidativo también en el epitelio olfatorio y en neuronas receptoras olfatorias (Getchell, et al., 2002).

Con referencia a los niveles de AChE se ha observado una disminución en las diferentes capas del BO en pacientes con EA acompañado de gran número de MNF y de placas neuríticas, por lo que distintos grupos de investigadores tratan de descifrar una correlación entre el deterioro olfatorio con los defectos colinérgicos en los pacientes con EA (Durand et al., 1998)., incluso se ha reportado que en individuos con el factor de riesgo genético presentan también un deterioro en su función olfatoria (Calhoun-Haney y Murphy et al., 2005). Además, los estudios de resonancia magnética en los enfermos de Alzheimer muestran una disminución en los volúmenes de los bulbos olfatorios (Thommann et al., 2009) (Ver figura 14). Esta disminución también se ha observado en ratones transgénicos del mutante para la APP y la presinilina (TgAPP/PS1) para la EA en el cual también se han encontrado disminuciones en los bulbos olfatorios por resonancia magnética (Lau et al., 2008).

Por otra parte, se han descrito grandes agregaciones asociadas a cantidades disminuidas de somatostatina que regula los niveles de expresión de la neprililina que es una peptidasa que cataliza la degradación proteolítica del péptido del A β (Saiz-Sanchez et al., 2009). Los agregados A β y de MNFs en el epitelio olfatorio se han detectado por Arnold (2010) en el epitelio olfatorio de un anciano de 84 años con la EA (Ver figura 15).

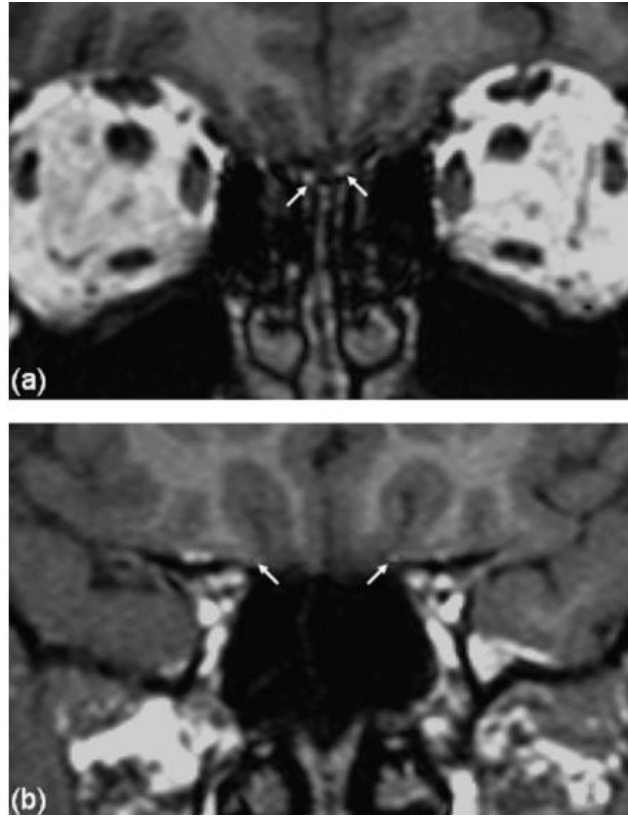


Figura 14. Escáner de corte coronal T1 con MRI de los bulbos olfatorios de un paciente con EA. En a, se muestra la parte caudal del bulbo y el tracto olfatorio. En b, se aprecia la región caudal del bulbo y el tracto olfatorio. En donde se observa la disminución de volumen (Reproducido de Thommann et al., 2009).

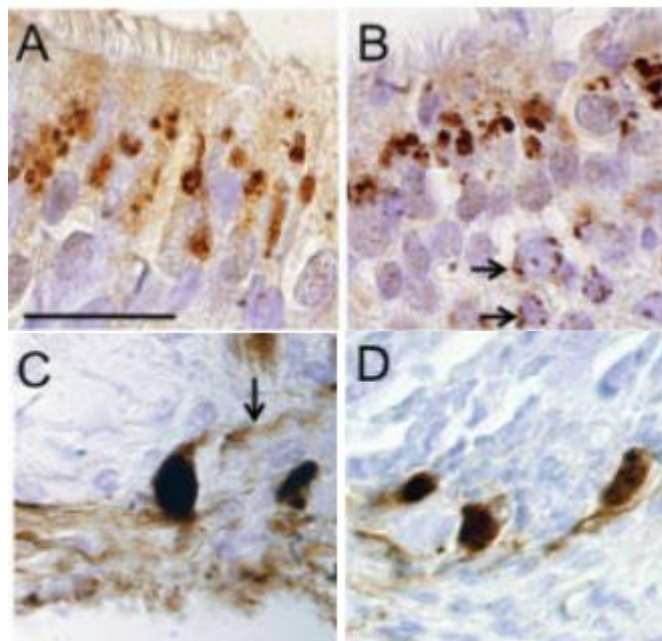


Figura 15. Epitelios olfatorios de una persona de 84 años de edad con la EA. En A y B se pueden apreciar los agregados de Aβ y en C y D se aprecian las MNF. (Reproducido de Arnold et al., 2010).

Los trabajos de Nordin y Murphy demuestran que existe un decremento considerable en la sensibilidad de la detección de olores en pacientes con mayor riesgo de padecer demencia (Nordin y Murphy et al., 1996). Esta pérdida progresiva de sensibilidad en el nivel de umbral odorante en la EA ocurre con una mayor severidad que los cambios en la identificación de olores o de la memoria olfatoria propiamente. Esto se explica porque las áreas de la corteza entorrinal y el hipocampo participan tanto en el procesamiento olfatorio como en la memoria olfatoria. Por tanto, las pruebas olfatorias que tienen un componente de memoria pueden ser utilizadas como una herramienta adicional para detectar la EA (Schiffman et al., 2001).

2.10 Modelos experimentales para la EA

Se han desarrollado varios modelos experimentales para reproducir la EA, y desde 1970 estos modelos han sido instrumentos valiosos que intentan explicar las bases moleculares, celulares, patológicas y conductuales de los humanos. Aunque son abundantes, ninguno es capaz de reproducir todas las características clínicas y patológicas asociadas a la EA (Wolfe, 2002; Balducci y Forloni, 2011). Un objetivo fundamental en todos estos modelos animales es conseguir replicar los síntomas de la patología, y enfocar su estudio en su desarrollo cronológico, así como también el esclarecimiento en el metabolismo de la APP humana y de las formas mutadas, y su degradación por la enzima neprilisina., y también en el estudio del origen de la proteína APOE y de la presenilina (PS), entre otros. Por lo anterior, se han generado ratones transgénicos dobles mutantes para la PS1/APP y los basados en la proteína tau (tau-JNPL3), hasta el desarrollo de los ratones triple transgénicos para las proteínas PS1/APP/tau (Nunan y Small; 2000; Pratico et al., 2001; Yasojima et al., 2001; Gotz et al., 2008) (Ver figura 16).

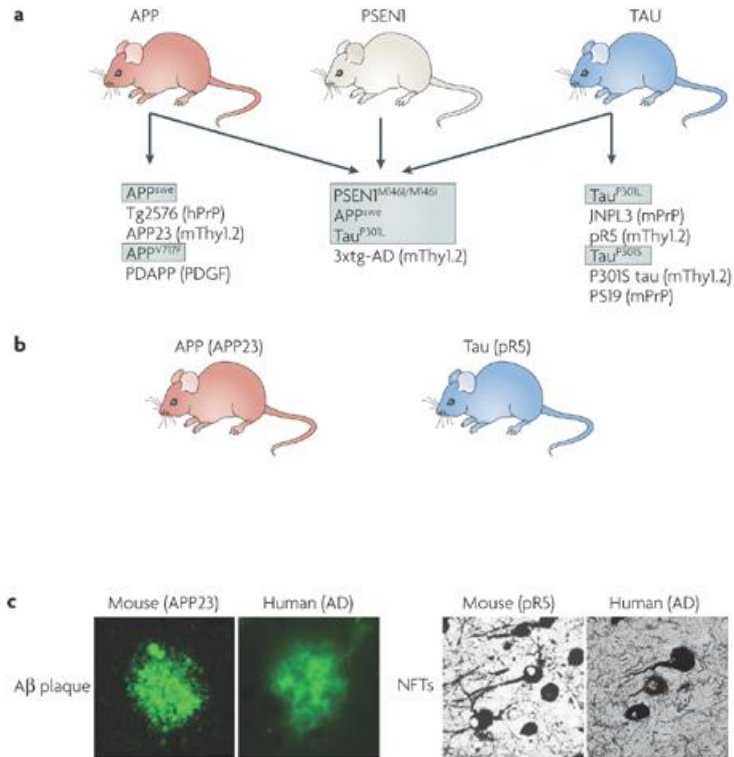


Figura 16. Tres ejemplos de ratones transgénicos para la APP, la PS1 y la TAU. En los recuadros se indican los nombres de los promotores que fueron usados para la expresión de APP (APP23) y Tau (pR5), en b. En c, las placas representativas de Aβ de un cerebro APP23 y humano con Alzheimer (AD) visualizado con el marcador thioflavina S (verde) y de MNFs de un cerebro pR5 y humano AD, ambos se visualizan con la técnica de impregnación de plata de Gallyas, a la derecha. Imágenes similares entre ambos modelo animal y EA (Reproducido de Gotz et al., 2008).

2.11 Modelo del ratón triple transgénico para la EA

La EA causa un deterioro progresivo de las funciones cognitivas, incluyendo la pérdida de memoria. Así, en el modelo del triple transgénico para la enfermedad de Alzheimer (3xTg-AD) creado por el Dr. Salvatore Oddo, el Dr. Frank LaFerla y sus colaboradores, a partir del mismo híbrido silvestre o Wild type (cepa129/C57BL6), el cual es de gran importancia porque sobreexpresa las tres principales proteínas alteradas en esta patología y porque alberga los tres genes mutados que expresan tanto el precursor de la proteína de Aβ (APP^{swe}), la presenilina-1 (PS_{1M146V}) como la tau_{P301L} (Oddo et al., 2003) (Ver figura 17).

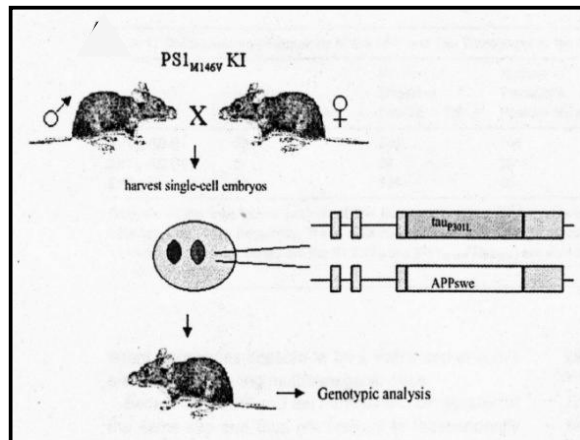


Figura 17. Se esquematiza la generación del ratón Triple Transgénico (3xTg-AD) desarrollado por el grupo de investigación del Dr. LaFerla, en la Universidad de Irvine en California (modificado de Oddo et al., 2003b).

La inmunoreactividad por el A β intraneuronal aparentemente es independiente de la taupatología en el ratón triple transgénico (Winton et al., 2011). Los depósitos extracelulares de A β son evidentes a los seis meses en la corteza frontal en las capas 4 a 5 y aumentan a los 12 meses de edad en donde se localizan también en el hipocampo. Con referencia a la patología de tau, esta es visible primero en el hipocampo del 3xTg-AD particularmente, entre las neuronas piramidales de CA1, y paulatinamente alcanza otras estructuras corticales, por lo que este modelo mimetiza la distribución de proteínas que ocurre en cerebros de humano con la EA. Se ha reportado una alteración conformacional de tau hiperfosforilada en el transcurso de la edad en el 3xTg-AD. A los seis meses de edad la disfunción sináptica y las deficiencias en la potenciación a largo plazo (LTP) son aparentes en este ratón, asociados a la inmunoreactividad positiva de la A β en la región CA1 de las neuronas piramidales y que se correlaciona con los impedimentos de plasticidad sináptica, incluyendo las deficiencias de LTP en los inicios de la patología (Oddo et al., 2003b).

Posteriormente se demostró que el 3xTg-AD produce A β con el progreso de la edad, y particularmente de la variante de 42 aminoácidos de longitud, lo que ha sugerido que la hipótesis sobre la acumulación de A β puede ser consecuencia de su sobreproducción, falla en el metabolismo o por fallas en su degradación, siendo alguno de éstos el mecanismo que inicia todas las formas del A β (Oddo et al., 2003a). A pesar

de la sobreexpresión equivalente de la APP humana y los transgenes humanos de tau, la disposición de A β se desarrolla antes de las marañas, de acuerdo con la hipótesis de la cascada amiloide. (LaFerla FM, 2010).

3. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad, existe mucho interés científico para establecer métodos de diagnóstico para la enfermedad de Alzheimer antes del deterioro irreversible del cerebro, característico de esta enfermedad. Al mismo tiempo se dispone de modelos transgénicos que permiten un estudio detallado de la progresión de la enfermedad como es el modelo triple transgénico (3xTg-AD) en áreas como hipocampo, corteza frontal y amígdala, pero a pesar de su importancia como primera vía de afección, en el bulbo olfatorio aún no se describe con detalle, a pesar de ser el primer sentido que se deteriora en los humanos que desarrollarán la EA en las etapas tempranas por la acumulación de tau y β -amiloide en la vía olfatoria. Por lo tanto, se requiere un estudio que permita relacionar la alteración del sustrato anatómico de la vía olfatoria con la detección de olores volátiles y de relevancia sexual, para ello el diseño experimental que se propone en el presente trabajo, es el estudio de la respuesta a los odorantes tanto sexualmente relevantes y los sexualmente irrelevantes (relacionados a alimentos) en hembras transgénicas de diferentes edades con la finalidad de saber si hay un proceso adaptativo en edades tempranas o si es irreversible cuando la patología se establece.

4. HIPÓTESIS

El ratón triple transgénico presentará una disminución en la conducta olfatoria conforme transcurre la enfermedad.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Evaluar la capacidad de discriminación olfatoria en hembras 3xTg-AD jóvenes y seniles comparados con sus controles (129/C57BL/6).

5.2 Objetivos particulares

Determinar si las ratonas presentan alteraciones en la detección de olores sexualmente relevantes (orina de macho).

Determinar si las ratonas tienen alteraciones en la detección de olores relacionados a alimentos (canela y fresa).

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Sujetos

El protocolo diseñado para este trabajo se realizó conforme a las normas internacionales para el manejo y uso de animales de experimentación establecidas por los National Institutes of Health (NIH) y la National Academy of Science², el cual fue presentado y aprobado por el Comité de Bioética del Instituto de Neurobiología (INB) de la Universidad Nacional Autónoma de México. Los ratones que se utilizaron como control fueron de la cepa 129/C57BL/6 (Wild type, WT), los ratones transgénicos (3xTg-AD) fueron donados por el Dr. Frank LaFerla de la Universidad de California. Los ratones fueron mantenidos en el bioterio en cajas de policarbonato (12x12x25 cm), en condiciones constantes de temperatura (20^o-25^oC) y humedad (40-70%), con un ciclo de luz/oscuridad de 12/12 hrs., iniciándose a las 10:00 a.m, con agua y alimento *ad libitum*. El alimento fue la dieta para ratón del laboratorio Purina Chow (Formula 5001).

² 2003; www.nih.gov.

Para el estudio se utilizaron ratones hembras obtenidos de las cruces de las unidades reproductivas, los ratones fueron destetados a los 21 días de edad, y todos fueron homocigotos 3xTg-AD. Se formaron 3 grupos, cada uno integrado por 6 individuos para cada condición experimental (control y transgénico). Los grupos se seleccionaron por edades (4-5 meses, 10-11 meses y 16-18 meses). En total se analizaron 36 animales a los cuales se les hicieron diferentes tareas conductuales.

6.2 Motivación sexual incentiva

Esta tarea conductual ha sido reportada previamente por Portillo y Paredes (2003), y se llevó a cabo en una arena rectangular de acrílico (100 X 50 cm). En las paredes más largas de la arena se hicieron unas aberturas a la altura del piso, las cuales fueron cubiertas con una malla de alambre. En cada abertura se ensambló una caja (15 X 25 X 25) dentro de la cual fue colocado un animal incentivo (una hembra en estro o un macho sexualmente activo de la misma cepa). Las dos aberturas se pusieron opuestas en diagonal y fueron cubiertas con una malla. Este procedimiento tiene la ventaja de que es posible cambiar aleatoriamente las cajas que contienen a los animales incentivos sin que los olores se mezclen. En frente de las cajas que contienen a los animales incentivos, se delimitó una zona (20 X 30 cm) denominada zona incentiva. Para iniciar el experimento, los sujetos fueron habituados a la arena en tres sesiones de 10 min. cada una, durante este procedimiento los animales incentivos no estuvieron presentes. La prueba fue similar a la habituación, pero en este caso los animales incentivos fueron colocados en cada una de las cajas laterales. En las pruebas las hembras experimentales pudieron oír, ver y oler a los animales incentivos (machos y hembras) pero no copular con ellos. Finalmente, se registró el tiempo que los animales experimentales pasaron en cada una de las zonas incentivas (el criterio utilizado fue que las ratonas colocaran sus dos miembros anteriores dentro de la zona) (Ver figura 18). La prueba tuvo duración de 10 minutos. Antes de cada sesión la arena y las jaulas de los animales incentivos se limpiaron con alcohol al 70%.

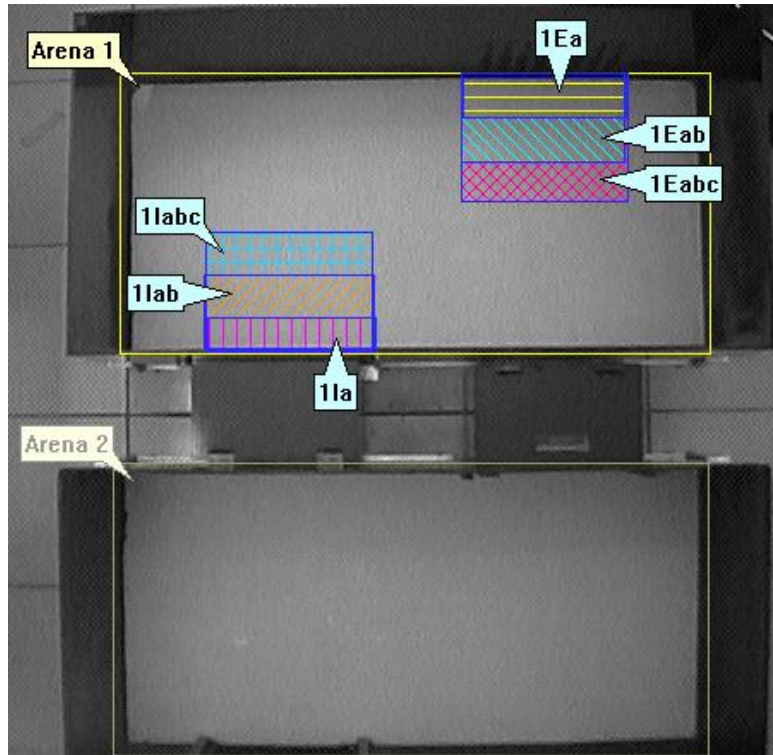


Figura 18. Prueba de motivación sexual incentivada. Esta fotografía muestra las arenas que se utilizaron para esta tarea conductual, así como también se marcan las zonas determinadas como zonas incentivadas (áreas señaladas en rayas de colores). Nótese que cerca de las zonas incentivadas se aprecian los compartimentos externos de la arena en donde se introducen a los animales incentivados.

6.3 Preferencia olfatoria

En esta prueba se cuantificó el tiempo en que los animales pasan oliendo e investigando los olores sexualmente relevantes. La prueba se realiza en una caja (40x60x40 cm) con frentes de plástico transparentes que permitía la observación de los animales se colocaron tres contenedores distribuidos en las dos esquinas y el otro al centro las cuales los ratones podían elegir. El orden en que estos contenedores fueron presentados a cada ratona fue aleatorio. Cada recipiente contenía uno de los siguientes tipos de aserrín:

- 1) Aserrín de machos: aserrín previamente expuesto a orina y heces de machos sexualmente activos.

2) Aserrín de hembras: fue expuesto a secreciones vaginales, orina y heces de hembras ovariectomizadas tratadas con benzoato de estradiol y progesterona para mantenerlas sexualmente receptivas.

3) Aserrín limpio: aserrín sin ningún tipo de secreción ni desecho animal.

Durante la prueba experimental se colocó al animal experimental al centro de la caja y se registró el tiempo que el ratón hembra investigó y olió cada contenedor (Ver figura 19). La prueba se realizó por duplicado de 10 minutos cada una. Las dos pruebas fueron separadas por al menos 48 hrs. Para el análisis de los datos se utilizó el valor promedio.

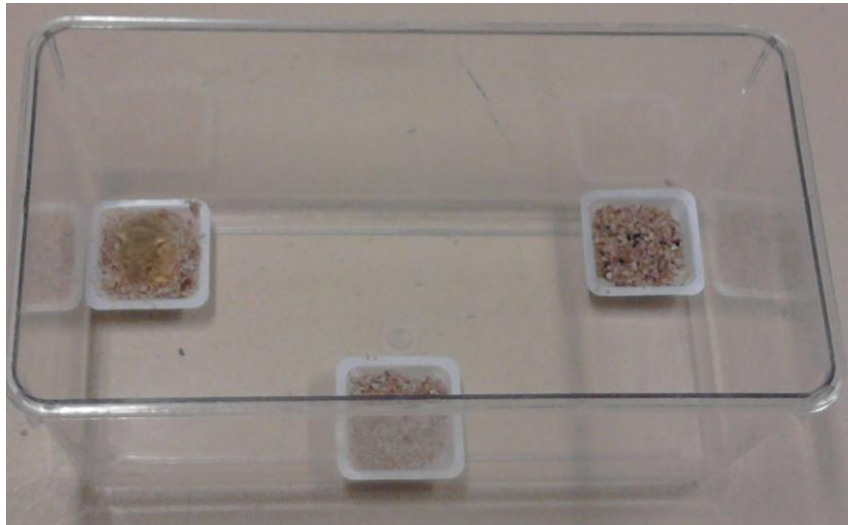


Figura 19. Prueba de preferencia olfatoria. En esta fotografía con vista área, se muestra la caja experimental en donde se realizó esta tarea conductual. Nótese la distribución de los contenedores cada uno con aserrín de macho, hembra y limpio.

6.4 Discriminación olfatoria a olores relacionados a alimentos.

Los estímulos de los olores relacionados a alimentos fueron esencias de canela y fresa, las cuales fueron encontradas como estímulos relevantes para los ratones después de probar una gama de más de diez aromas entre éstos: cítricos, plátano, hierbas y perfumes. El animal experimental se colocó en una jaula de acrílico, la cual estaba equipada en su superficie con una rejilla cubierta con una barrera de malla de alambre de acero inoxidable. Los estímulos olfatorios fueron presentados en un pedazo de papel

filtro con 10µl de cada esencia pegado a un contenedor de plástico que posteriormente se puso contra la malla de alambre para que los olores volátiles de las esencias estuvieran disponibles. Cada prueba se compone de dos períodos consecutivos de exposiciones a la solución salina seguida de tres presentaciones de cada uno de los estímulos: canela y fresa. Cada estímulo fue presentado durante 2 minutos, con intervalos de 1 minuto entre cada uno de los sucesivos. Se registró el tiempo que el sujeto colocó su nariz contra los barrotos de la red, si el animal investiga el nuevo estímulo llegamos a la conclusión de que el animal puede discriminar entre los dos olores (Ver figura 20).



Figura 20. Prueba de discriminación olfatoria a olores relacionados a alimentos. En la presente figura se esquematiza el procedimiento que se llevó a cabo en esta tarea conductual.

6.5 Análisis de los resultados

Para las pruebas conductuales de motivación sexual incentiva y las pruebas de preferencia sexual, se corrió la prueba estadística no paramétrica de Kruskal-Wallis ya que los datos no tuvieron una distribución normal. Para la prueba de discriminación olfatoria de olores relacionados a alimentos se corrió la prueba no paramétrica de medidas repetidas de Friedman. Los datos de la distancia recorrida, la velocidad de desplazamiento y el registro de tiempo de compartimientos incentivos vacíos fueron analizados mediante una prueba K-Wallis. En caso de obtenerse diferencias significativas se realizó una prueba post hoc U de Mann-Whitney. Las pruebas estadísticas se corrieron con ayuda de los software comerciales: Statview y GB-Stat v10.

7. RESULTADOS

Con la finalidad de conocer la capacidad olfatoria de los ratones 3xTg-AD, se realizaron las comparaciones entre las edades y los grupos experimentales de las siguientes tareas conductuales: motivación sexual incentivada, preferencia olfatoria, y discriminación olfatoria a olores relacionados a alimentos.

7.1 Motivación sexual incentivada

Esta prueba conductual se llevó a cabo en ratonas WT y 3xTg-AD divididas en tres grupos con relación a su edad: 1) 4-5 meses, 2) 10-11 meses y 3) 16-18 meses. Posterior a cada prueba se hizo un frotis vaginal a cada ratona experimental con el fin de establecer en qué ciclo estral se encontraban al momento de la realización de la prueba. Dado lo anterior, los datos conductuales se clasificaron en dos grupos con relación a los ciclos: 1) ratonas en anestro (metaestro y diestro) y 2) ratonas en estro.

7.1.1 Distancia recorrida y velocidad de desplazamiento

Previo a la tarea conductual de motivación sexual incentivada, las ratonas experimentales se habituaron en las arenas durante tres días antes de introducir a los animales incentivados (hembra en estro y macho experto copulador) en los compartimientos externos de cada arena. Mismo periodo de tiempo en que se obtuvieron datos concernientes al total de la distancia recorrida (km) y a la velocidad de desplazamiento (cm/seg) alrededor de la arena al final de cada sesión de habituación. Lo anterior con la finalidad de determinar si las ratonas presentaban algún tipo de deficiencia locomotora que hubiese interferido con los resultados conductuales. En la tabla 1 se muestran los resultados obtenidos en la medición de estos dos parámetros de distancia ($\chi_{(1)}^2=1.04$ $P=0.3$) y velocidad ($\chi_{(1)}^2=2.11$ $P=0.13$) en donde no se encontraron diferencias significativas entre los grupos de ratonas experimentales WT y 3xTg-AD, lo cual quiere decir que las ratonas experimentales 3xTg-AD no presentan problemas locomotores que les impida olfatear cada compartimiento al momento de realizar la tarea de motivación sexual incentivada.

	Distancia		Velocidad	
4- 5 meses	WT	3xTg-AD	WT	3xTg-AD
	5±1	4±1	9±2	7±1
10-11 meses	WT	3xTg-AD	WT	3xTg-AD
	3±1	3±1	6±1	5±1
16-18 meses	WT	3xTg-AD	WT	3xTg-AD
	4±1	5±1	6±1	7±1

Tabla 1. Las medias y los \pm SEM de la distancia recorrida en km y la velocidad de desplazamiento en seg/cm que pasaron las ratonas experimentales WT y 3xTg-AD previo a la tarea de motivación sexual inducida..

7.1.2 Registro de tiempo en compartimientos incentivos vacíos.

También previo a la realización de la conducta de motivación sexual incentiva se promedió el tiempo (segundos) que cada ratona experimental WT y 3xTg-AD pasó en cada compartimiento sin que estuvieran los animales incentivos, es decir, con los compartimientos vacíos, durante los tres días correspondientes a la habituación de las ratonas experimentales al contexto de la arena.

	WT		3xTg-AD	
	Externo	Interno	Externo	Interno
4-5 meses	92±8	101±13	83±13	98±13
10-11 meses	88±18	82±16	60±17	73±26
16-18 meses	104±18	84±14	108±15	98±13

Tabla 2. Las medias y los \pm SEM de la distancia recorrida en km y la velocidad de desplazamiento medida en seg/cm en las ratonas experimentales WT y 3xTg-AD previo a la tarea de motivación sexual inducida..

En la tabla 2 se muestran los resultados obtenidos en los dos compartimientos de la arena (externo e interno), sin los animales incentivos, esto con la finalidad de saber si las ratonas 3xTg-AD presentan problemas de lateralidad, los cuales influyan negativamente con los datos conductuales. El análisis estadístico no arrojó diferencias significativas ($\chi_{(1)}^2=0.89$ $P=0.82$) en la preferencia de los compartimientos entre cada

grupo WT y 3xTg-AD a distintas edades. Lo anterior quiere decir que las ratonas hembras transgénicas no están predispuestas a preferir un compartimento incentivo *per se*, por lo que se deduce que su desempeño en la tarea de motivación sexual incentiva dependerá solamente a la estimulación olfatoria a olores sexualmente relevantes.

7.1.3 Motivación sexual incentiva a los 4-5 meses de edad

En la figura 21 se muestra el promedio de tiempo (seg) obtenido en la tarea de motivación sexual incentiva en ratonas WT y 3xTg-AD a los 4-5 meses de edad en el ciclo de anestro. En el grupo de ratonas WT se encontraron diferencias significativas ($\chi_{(1)}^2=5.58$ $P=0.01$) entre el tiempo que pasan las ratonas experimentales en el compartimento del macho con respecto al de la hembra incentivo, siendo este último en donde registró un mayor tiempo. En el caso del grupo 3xTg-AD no se encontraron diferencias significativas ($\chi_{(1)}^2=1.1$ $P=0.29$) dado que pasaron aproximadamente el mismo tiempo entre el incentivo macho y el incentivo hembra. Lo anterior significa que las ratonas experimentales de ambos grupos WT y 3xTg-AD no estuvieron motivadas en pasar más tiempo en el incentivo macho porque las hembras experimentales no estaban receptivas debido a su ciclo de anestro.

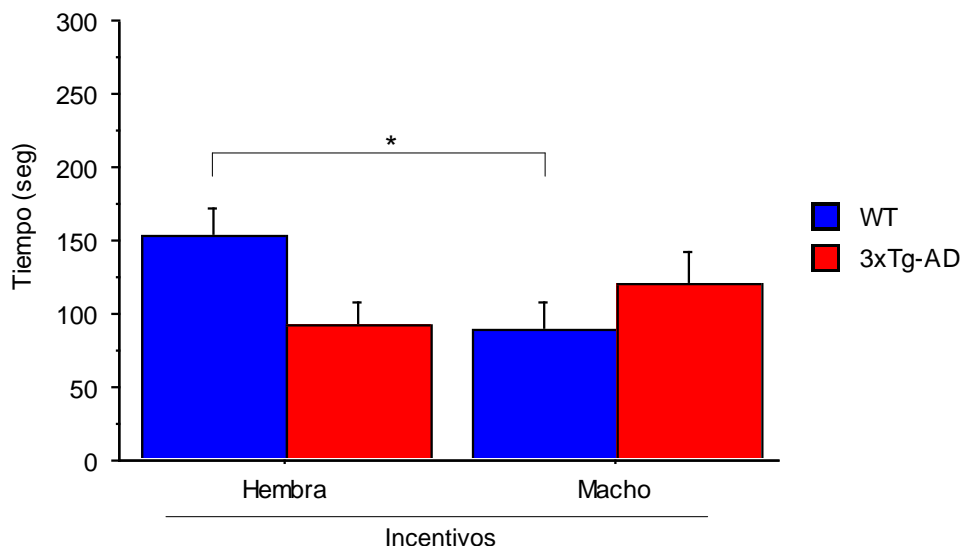


Figura 21. Motivación sexual incentiva de ratonas de 4-5 meses en anestro. Las medias y los \pm SEM del tiempo que pasaron las ratonas experimentales WT y 3xTg-AD con cada incentivo durante la tarea conductual *(U-Mann $P<0.05$).

En la figura 22 se grafican los resultados conductuales obtenidos en la tarea de motivación sexual incentiva en ratonas WT y 3xTg-AD de 4-5 meses de edad en el ciclo de estro. En el grupo WT se encontraron diferencias significativas ($\chi_{(1)}^2=4.71$ P=0.02) entre el tiempo que pasaron con ambos incentivos hembra y macho, registrando el mayor tiempo en el incentivo macho, lo cual significa que las ratonas WT pueden discriminar entre los olores sexualmente relevantes y que además estuvieron motivadas a pasar más tiempo con el incentivo macho dado su ciclo de estro en donde se encuentran sexualmente receptivas las hembras experimentales. Sin embargo, en el grupo 3xTg-AD la prueba estadística no reveló pruebas significativas para los dos incentivos ($\chi_{(1)}^2=0.705$ P=0.4), lo cual se sugiere que en esta etapa temprana de la enfermedad, las ratonas transgénicas tienen una alteración en la discriminación de olores sexuales y por lo tanto influye en su motivación sexual.

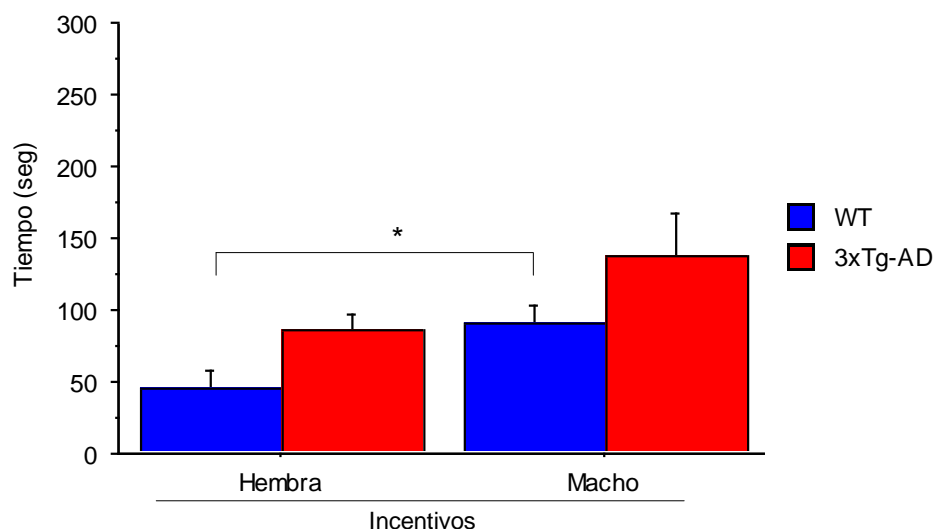


Figura 22. Motivación sexual incentiva de ratonas de 4-5 meses en estro. Las medias y los \pm SEM del tiempo que pasaron las ratonas experimentales WT y 3xTg-AD con cada incentivo durante la tarea conductual *(U-Mann P<0.05).

7.1.4 Motivación a olores sexuales a los 10-11 meses de edad

En la figura 23 se muestran los resultados conductuales obtenidos en la tarea de motivación sexual incentiva en ratonas WT y 3xTg-AD de 10-11 meses de edad en el ciclo de anestro. Los resultados obtenidos en el grupo WT revelaron que no hay diferencias significativas entre los incentivos ($\chi_{(1)}^2=0.92$ P=0.33), así como también no se encontraron diferencias en el grupo 3xTg-AD ($\chi_{(1)}^2=3.69$ P=0.54), lo cual significa

que las ratonas experimentales no están motivadas sexualmente debido a la etapa del ciclo estral al momento de realizar la tarea conductual, y por lo tanto no pasaron más tiempo en el compartimiento del macho.

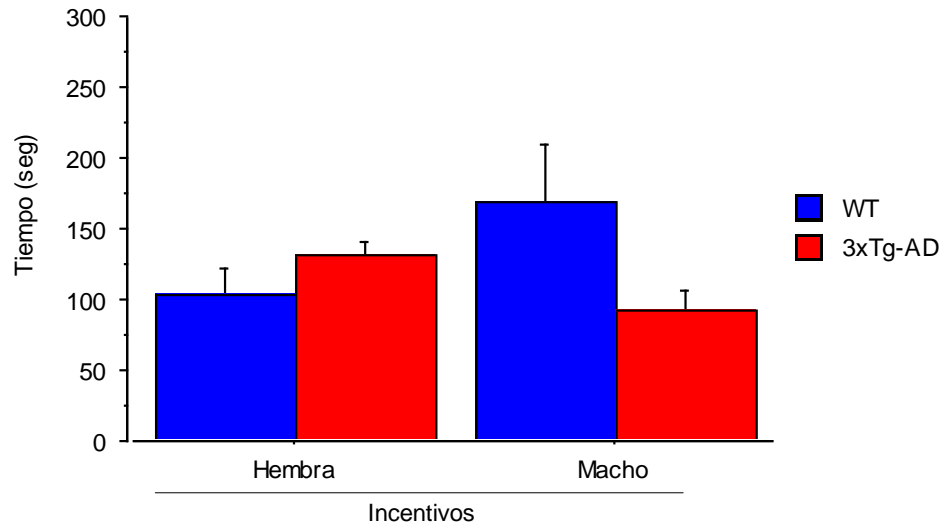


Figura 23. Motivación sexual incentiva de ratonas de 10-11 meses en anestro. Las medias y los \pm SEM del tiempo que pasaron las ratonas experimentales WT y 3xTg-AD con cada incentivo durante la tarea conductual.

En la figura 24 se grafica el promedio de tiempo que se obtuvo de las ratonas experimentales WT y 3xTg-AD en la tarea de motivación sexual incentiva en ratonas de 10-11 meses de edad en ciclo de estró. El análisis estadístico reveló diferencias significativas ($\chi_{(1)}^2=8.3$ $P=0.003$) entre los compartimientos incentivos en el grupo de ratonas WT, registrando el mayor tiempo con el incentivo macho respecto al incentivo hembra, caso contrario del grupo 3xTg-AD en donde no tuvo preferencia específica para un incentivo ($\chi_{(1)}^2=2.07$ $P=0.14$), lo que sugiere que en las ratonas transgénicas persiste su alteración en la discriminación de olores sexuales y por tal motivo afecta su motivación sexual.

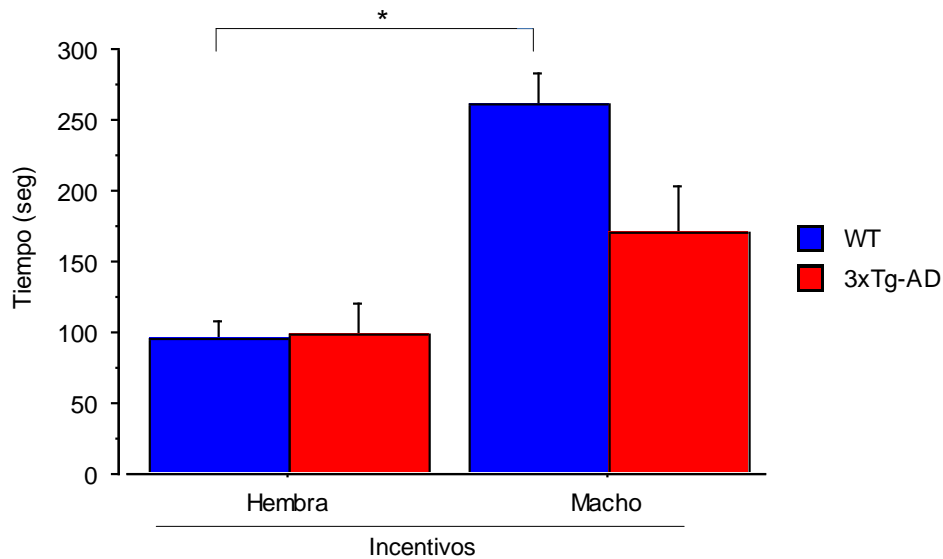


Figura 24. Motivación sexual incentiva de ratonas de 10-11 meses en estro. Las medias y los \pm SEM del tiempo que pasaron las ratonas experimentales WT y 3xTg-AD con cada incentivo durante la tarea conductual *(U-Mann $P < 0.001$).

7.1.5 Motivación a olores sexuales a los 16-18 meses de edad

En la figura 25 se muestran los resultados conductuales obtenidos en la tarea de motivación a olores sexuales en ratonas WT y 3xTg-AD de 16-18 meses de edad en el ciclo de anestro. Los resultados estadísticos reflejan que en el grupo WT no existe diferencia significativas entre los incentivos ($\chi_{(1)}^2 = 1.86$ $P = 0.17$), así como también en el grupo 3xTg-AD ($\chi_{(1)}^2 = 0.49$ $P = 0.48$), debido a que en esta etapa de su ciclo estral no se encuentran receptivas, y por tanto, no prefieren pasar más tiempo con el macho incentivo.

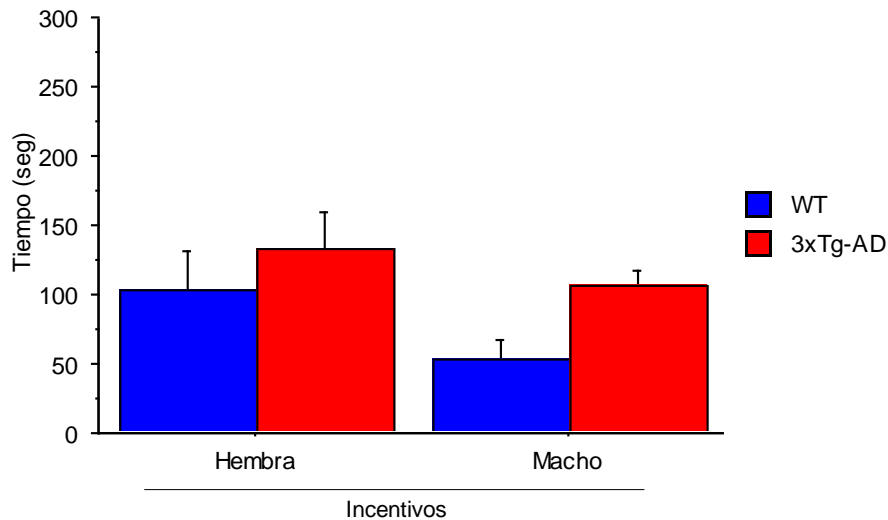


Figura 25. Motivación sexual incentiva de ratonas de 16-18 meses en anestro. Las medias y los \pm SEM del tiempo que pasaron las ratonas experimentales WT y 3xTg-AD con cada incentivo durante la tarea conductual.

En la figura 26 se grafican los resultados conductuales obtenidos en la tarea de motivación a olores sexuales en ratonas WT y 3xTg-AD de 16-18 meses de edad, las cuales se encontraban en el ciclo de estro. Los resultados muestran que las hembras WT tienen mayor interés en pasar más tiempo con el macho incentivo ($\chi_{(1)}^2=3.57$ $P=0.5$), sin embargo las ratonas 3xTg-AD no demuestran una motivación sexual hacia el macho al no encontrarse diferencias significativas ($\chi_{(1)}^2=0.91$ $P=0.33$).

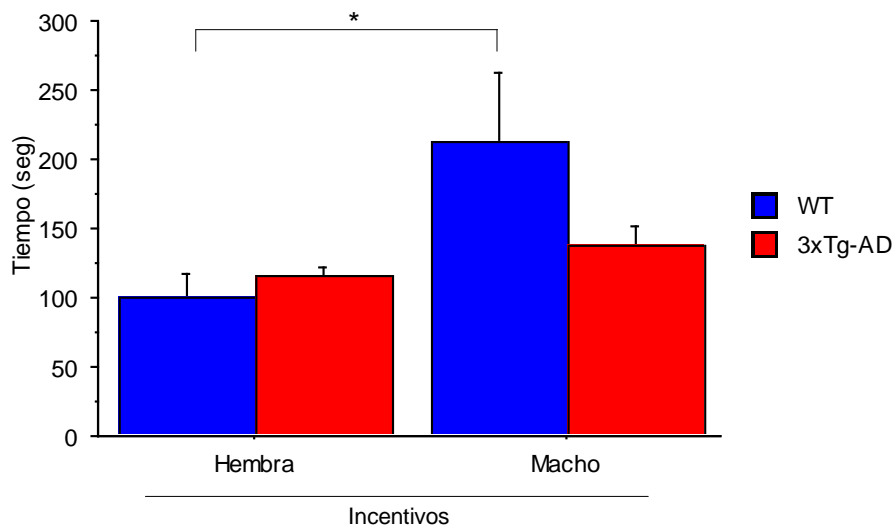


Figura 26. Motivación sexual incentiva de ratonas de 16-18 meses en estro. Las medias y los \pm SEM del tiempo que pasaron las ratonas experimentales (WT y 3xTg-AD) con cada incentivo durante la tarea conductual *(U-Mann $P<0.5$).

7.2 Preferencia olfatoria

Esta prueba conductual se llevó a cabo en ratonas WT y 3xTg-AD divididas en tres grupos en relación a su edad: 1) 4-5 meses, 2) 10-11 meses y 3) 16-18 meses. Posterior a cada prueba se hizo un frotis vaginal a cada ratona experimental con el fin de establecer en qué ciclo estral se encontraban al momento de la realización de la prueba, por lo que los resultados conductuales se clasificaron en dos grupos dependiendo a los ciclos: 1) ratonas en metaestro y diestro (anestro) y 2) ratonas en estro.

7.2.1 Preferencia olfatoria a los 4-5 meses de edad

En la figura 27 se muestran los resultados conductuales obtenidos en la tarea de preferencia olfatoria en ratonas WT y 3xTg-AD de 4-5 meses de edad en el ciclo de anestro. En el grupo WT no se encontraron diferencias significativas entre los tres tipos de aserrín ($\chi_{(5)}^2=4.05$ P=0.13), mismo comportamiento que presentaron las ratonas 3xTg-AD ($\chi_{(5)}^2=2.19$ P=0.33). Lo cual sugiere que ambos grupos no tuvieron preferencia sexual de pasar más tiempo en el aserrín del macho debido a su ciclo estral.

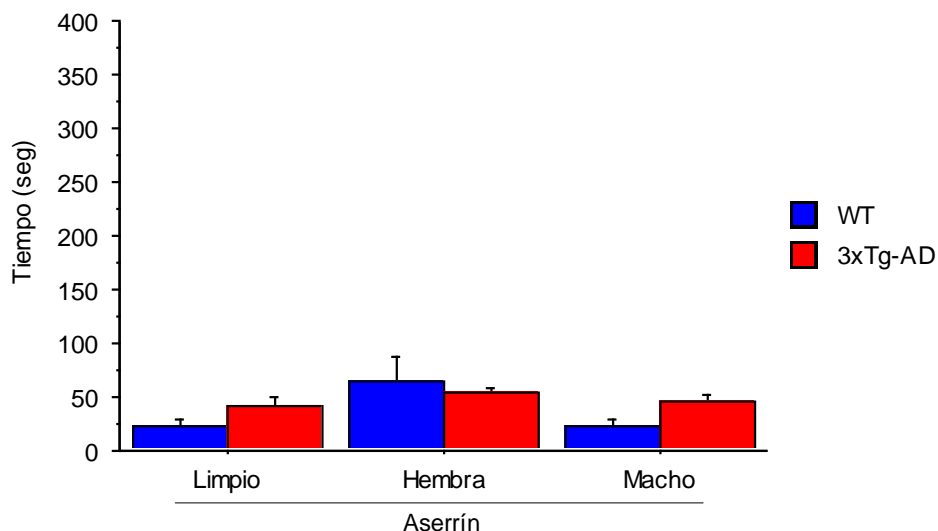


Figura 27. Preferencia olfatoria de ratonas de 4-5 meses de edad en anestro. Las medias y los \pm SEM del tiempo que pasaron las ratonas experimentales WT y 3xTg-AD en el aserrín limpio, en aserrín de hembra y en aserrín de macho.

En la figura 28 se grafican los resultados conductuales obtenidos en la tarea de preferencia olfatoria en ratonas WT y 3xTg-AD de 4-5 meses de edad en ciclo de estro. En el grupo WT se encontraron diferencias significativas ($\chi_{(5)}^2=6.14$ $P=0.046$) en los tres tipos de aserrín, ya que discrimina entre el aserrín de hembra y el aserrín de macho, este último en donde se registró una mayor preferencia. En el grupo 3xTg-AD también se encontraron diferencias significativas ($\chi_{(5)}^2=7.38$ $P=0.024$) para los tres tipos de aserrín, en donde se observa que discriminó entre los tres tipos de aserrín, y en donde también se muestra que las ratonas experimentales pasaron más tiempo en el aserrín de macho. Estos resultados sugieren que tanto el grupo de WT como el 3xTg-AD no presentaron ningún deterioro olfatorio ya que tuvieron preferencia de pasar más tiempo en el aserrín de macho.

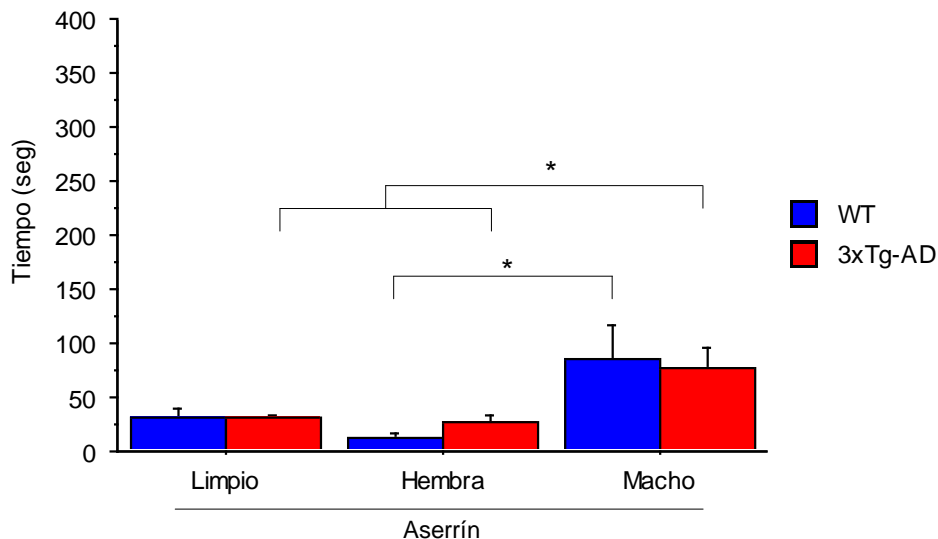


Figura 28. Preferencia olfatoria de ratonas de 4-5 meses de edad en estro. Las medias y los \pm SEM del tiempo que pasaron las ratonas experimentales WT y 3xTg-AD en el aserrín limpio, en aserrín de hembra y en aserrín de macho *(U-Mann $P < 0.05$).

7.2.2 Preferencia olfatoria a los 10-11 meses de edad

En la figura 29 se muestran los resultados conductuales obtenidos en la tarea de preferencia olfatoria en ratonas WT y 3xTg-AD de 10-11 meses de edad en ciclo de anestro. En el grupo WT no se encontraron diferencias significativas ($\chi_{(5)}^2=1.53$ $P=0.46$) entre los tres tipos de aserrín. En el grupo 3xTg-AD tampoco se encontraron diferencias significativas ($\chi_{(5)}^2=1.71$ $P=0.42$), lo cual sugiere que al no estar receptivas, no tienen preferencia olfatoria de olores sexualmente relevantes.

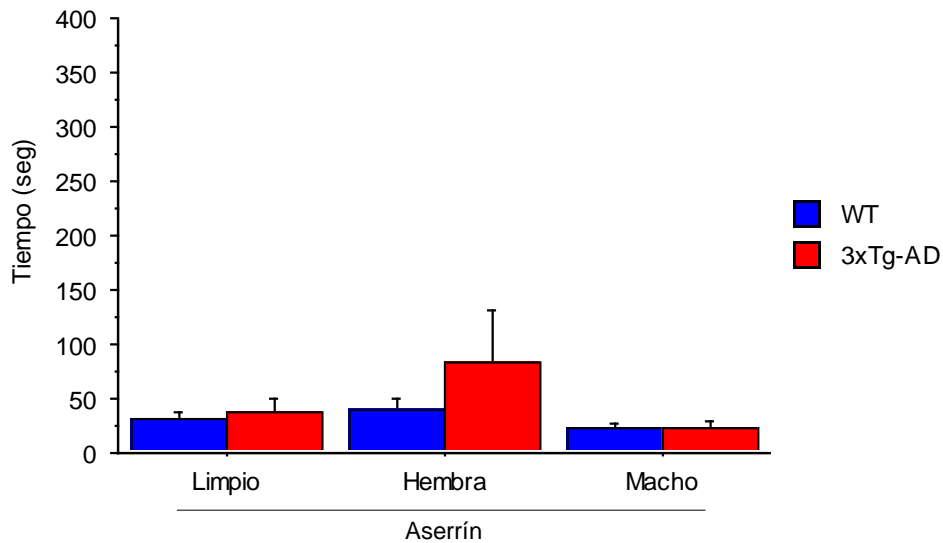


Figura 29. Preferencia olfatoria de ratonas de 10-11 meses de edad en anestro. Las medias y los \pm SEM del tiempo que pasaron las ratonas experimentales WT y 3xTg-AD en el aserrín limpio, en aserrín de hembra y en aserrín de macho.

En la figura 30 se grafican los resultados conductuales obtenidos en la tarea de preferencia olfatoria en ratonas WT y 3xTg-AD de 10-11 meses de edad en ciclo de estro. Los resultados mostraron diferencias significativas ($\chi_{(5)}^2=10.38$ $P=0.005$) entre los tres tipos de aserrín en el grupo WT y también se observa que las hembras experimentales pasaron más tiempo en el aserrín del macho, en comparación con el aserrín de hembra., mientras que en el grupo 3xTg-AD sólo pudieron discriminar entre el aserrín limpio con el aserrín de macho ($\chi_{(5)}^2=11.18$ $P=0.003$), sin embargo no pudieron discriminar entre el aserrín de hembra con el aserrín de macho. Estos resultados sugieren que el grupo 3xTg-AD tiene una alteración en su preferencia olfatoria, al ser incapaces de discriminar entre dos tipos de olores sexualmente relevantes.

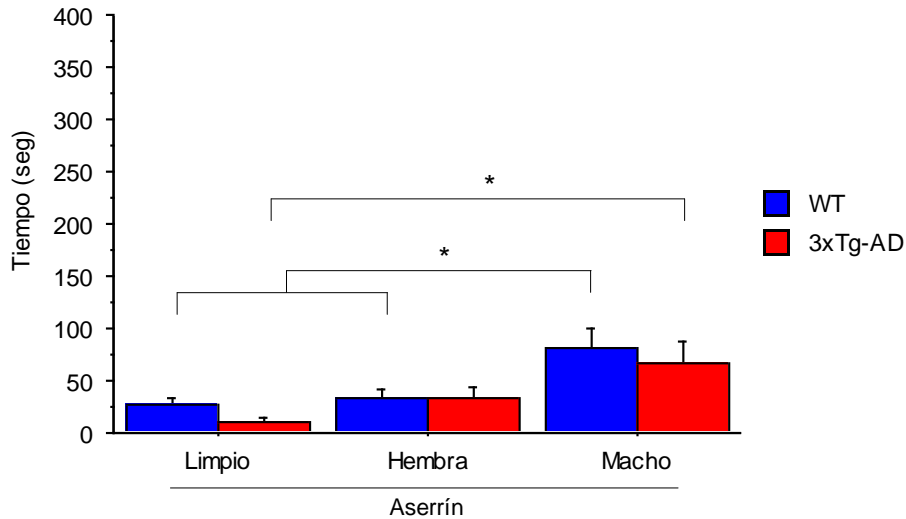


Figura 30. Preferencia olfatoria de ratonas de 10-11 meses de edad en estro. Las medias y los \pm SEM del tiempo que pasaron las ratonas experimentales WT y 3xTg-AD en el aserrín limpio, en aserrín de hembra y en aserrín de macho *(U-Mann $P < 0.05$).

7.2.3 Preferencia olfatoria a los 16-18 meses de edad

En la figura 31 se muestran los resultados conductuales obtenidos en la tarea de preferencia olfatoria en ratonas WT y 3xTg-AD de 16-18 meses de edad en ciclo de anestro. En el grupo WT no se encontraron diferencias significativas ($\chi_{(5)}^2 = 4.45$ $P = 0.61$), así como también no se encontraron en el grupo 3xTg-AD ($\chi_{(5)}^2 = 3.71$ $P = 0.053$). Estos resultados sugieren que las hembras experimentales de ambos grupos no tienen preferencia olfatoria en los olores sexuales de macho.

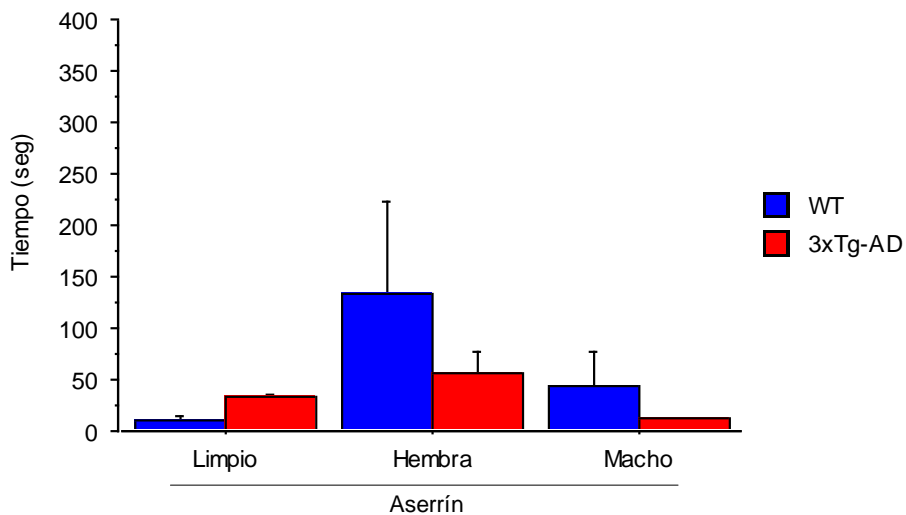


Figura 31. Preferencia olfatoria de ratonas de 16-18 meses de edad en anestro. Las medias y los \pm SEM del tiempo que pasaron las ratonas experimentales WT y 3xTg-AD en el aserrín limpio, en aserrín de hembra y en aserrín de macho.

En la figura 32 se grafican los resultados conductuales obtenidos en la tarea de preferencia olfatoria de ratonas WT y 3xTg-AD de 10-11 meses de edad en el ciclo de estro. En el grupo WT se encontraron diferencias significativas en los tres tipos de aserrín ($\chi_{(5)}^2=11.38$ P=0.003) y se muestra que discriminan entre el aserrín limpio con respecto al aserrín de macho, y también discriminan entre el aserrín de hembra contra el aserrín de macho, último en el cual pasaron un mayor tiempo. Lo anterior sugiere que las hembras tuvieron preferencia olfatoria para olores sexualmente relevantes de macho. En contraparte, el grupo 3xTg-AD no presentó diferencias significativas entre los tres tipos de aserrín ($\chi_{(5)}^2=2.19$ P=0.33), lo cual sugiere un deterioro en su preferencia olfatoria al no poder discriminar entre olores sexualmente relevantes.

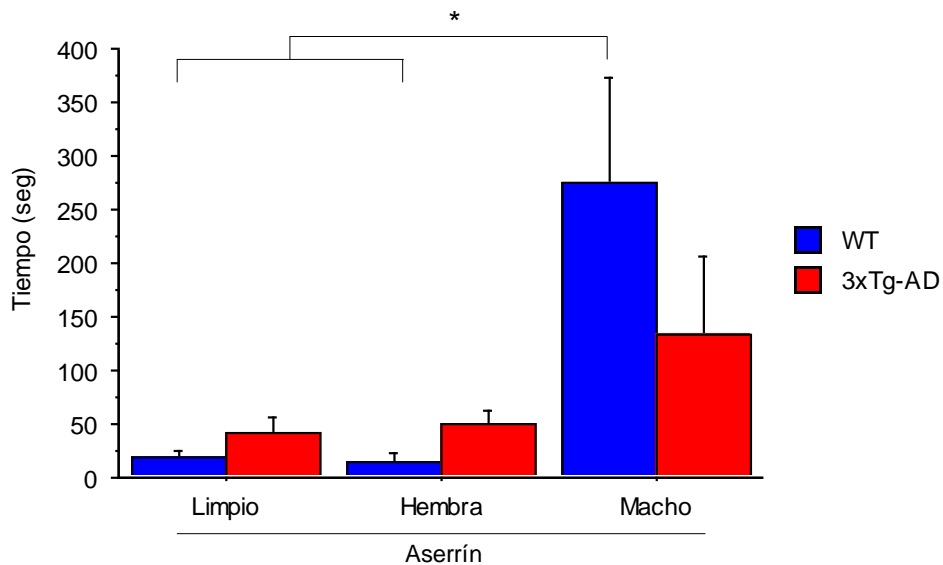


Figura 32. Preferencia olfatoria de ratonas de 16-18 meses de edad en estro. Las medias y los \pm SEM del tiempo que pasaron las ratonas experimentales WT y 3xTg-AD en el aserrín limpio, en aserrín de hembra y en aserrín de macho *(U-Mann P<0.05).

7.3 Discriminación olfatoria de olores volátiles asociados a alimentos

Esta prueba fue utilizada para evaluar la capacidad de discriminación olfatoria en los ratones WT y 3xTg-AD, con el fin de saber si éstos últimos tenían una incapacidad de detectar olores de alimentos, lo cual supondría que tuvieran una degeneración en el bulbo olfatorio principal.

7.3.1 Discriminación olfatoria a los 4-5 meses

En la figura 33 se presenta la gráfica de discriminación a olores volátiles relacionado a alimentos del grupo de ratones WT de 4-5 mese de edad, donde se muestran diferencias significativas entre las distintas exposiciones de odorantes ($\epsilon_{(7)}^2= 0.25$ P=0.0007), en donde se observan las diferencias en la última exposición de la canela contra la primera exposición de fresa, lo cual sugiere que las ratonas pueden discriminar entre dos olores volátiles.

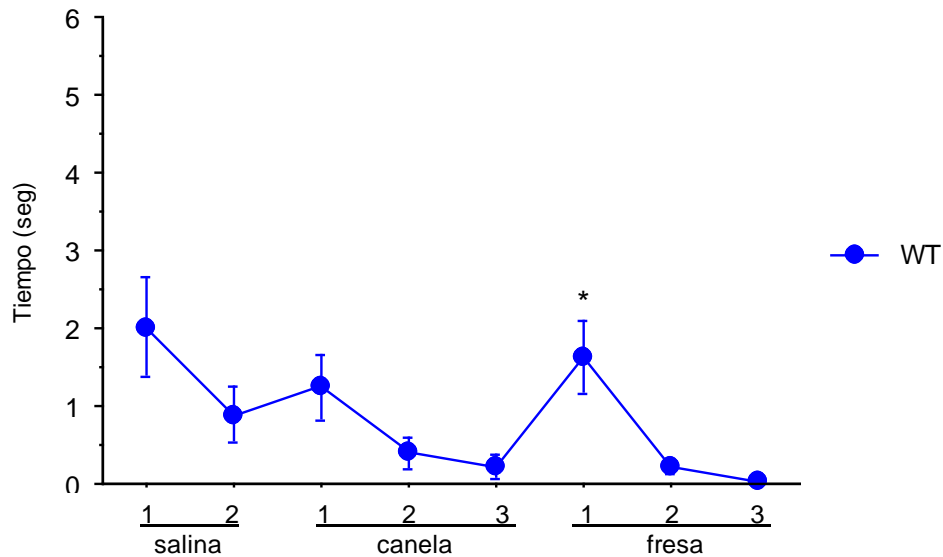


Figura 33. Discriminación olfatoria de ratonas WT de 4-5 meses de edad. Las medias y los \pm SEM del tiempo que pasaron las ratonas experimentales en las exposiciones de olores volátiles *(U-Mann P<0.01).

En la figura 34 se muestran los resultados de la tarea conductual de discriminación de olores volátiles relacionados a alimentos en donde los resultados muestran diferencias significativas ($\epsilon_{(7)}^2= 0.25$ P=0.0007) en la discriminación olfatoria. Las diferencias se pueden observar entre la última exposición de salina contra la primera de canela, y en la última exposición de canela contra la primera de fresa. Estos datos sugieren que las ratonas 3xTg-AD no presentan ningún deterioro en su capacidad de discriminar entre estos olores volátiles.

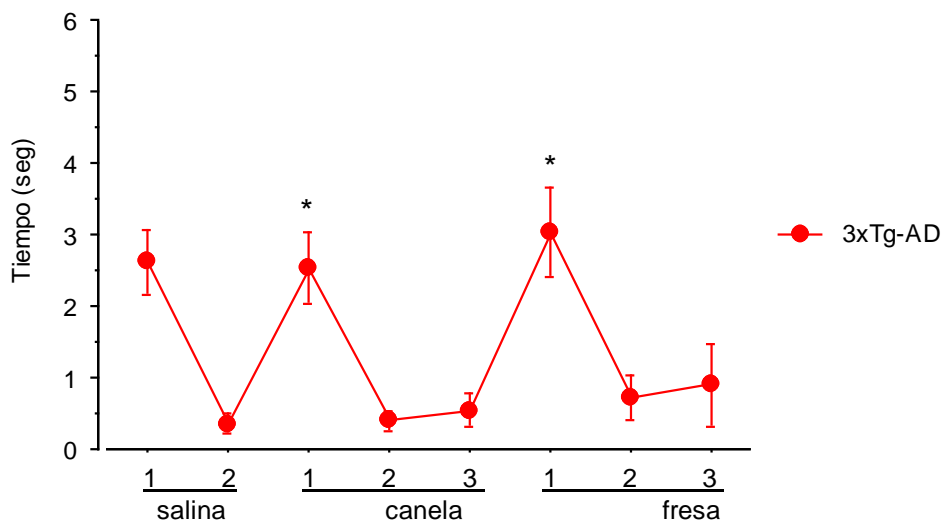


Figura 34. Discriminación olfatoria de ratonas 3xTg-AD de 4-5 meses de edad. Las medias y los \pm SEM del tiempo que pasaron las ratonas experimentales en las exposiciones de olores volátiles *(U-Mann $P < 0.01$).

7.3.2 Discriminación olfatoria a los 10-11 meses

En la figura 35 se presenta la gráfica de discriminación a olores volátiles relacionados a alimentos del grupo de los WT de 10-11 meses de edad, en donde se encontraron diferencias significativas ($\epsilon_{(7)}^2 = 0.34$ $P = 0.0006$), marcadas en la última exposición de solución salina contra la primera de canela, y también entre la última exposición a canela contra la primera de fresa lo cual supone que los animales discriminan entre los olores.

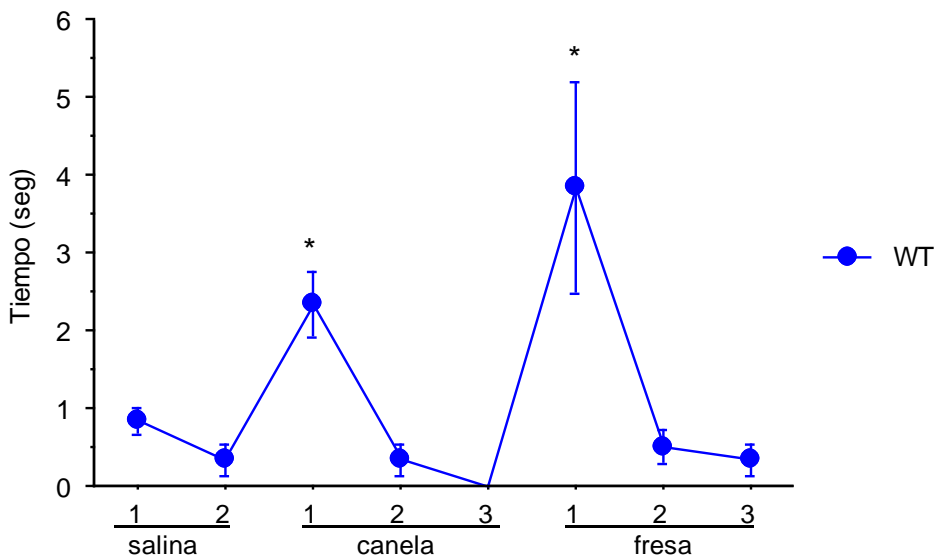


Figura 35. Discriminación olfatoria de ratonas WT de 10-11 meses de edad. Las medias y los \pm SEM del tiempo que pasaron las ratonas experimentales en las exposiciones de olores volátiles *(U-Mann $P < 0.01$).

En la figura 36 se muestran los resultados de la tarea conductual de discriminación de olores volátiles relacionados a alimentos en el grupo de los ratones 3xTg-AD a los 10-11 meses de edad. A pesar que los resultados mostraron diferencias significativas ($\epsilon_{(7)}^2= 0.14$ $P=0.02$) entre el total de las exposiciones, no se observaron diferencias entre la última exposición de salina contra la primera de fresa, y tampoco entre la última exposición de canela contra la primera de fresa, que son las comparaciones que se realizan en esta prueba, por lo que se deduce que los ratones transgénicos a partir de esta edad tiene un deterioro en la discriminación de los olores volátiles.

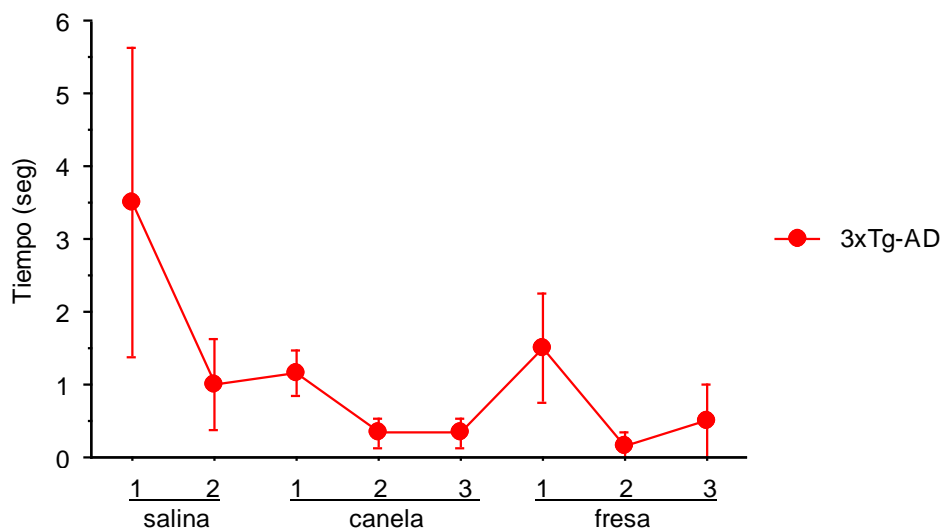


Figura 36. Discriminación olfatoria de ratonas 3xTg-AD de 10-11 meses de edad. Las medias y los \pm SEM del tiempo que pasaron las ratonas experimentales en las exposiciones de olores volátiles.

7.3.3 Discriminación olfatoria los 16-18 meses

En la figura 37 se muestra la gráfica de discriminación a olores volátiles relacionados a alimentos de ratones controles WT de 16-18 mese de edad, en donde se encontraron diferencias significativas ($\epsilon_{(7)}^2= 0.088$ $P=0.03$) que se reflejan en la última exposición a canela contra la primera de fresa lo cual supone que los animales pueden discriminar entre ambos olores volátiles.

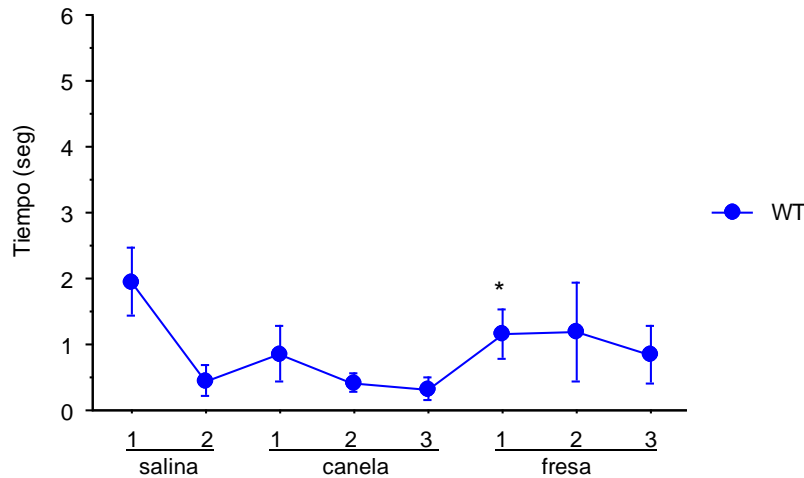


Figura 37. Discriminación olfatoria de ratonas WT de 16-18 meses de edad. Las medias y los \pm SEM del tiempo que pasaron las ratonas experimentales en las exposiciones de olores volátiles.

En la figura 38 se muestran los resultados de la tarea conductual de discriminación de olores volátiles relacionados a alimentos en los ratones 3xTg-AD a los 16-18 meses de edad. Los resultados estadísticos muestran diferencias entre todas las exposiciones ($\epsilon_{(7)}^2=0.14$ $P=0.007$) sin embargo, estas no se hacen evidentes entre la última exposición de salina contra la primera de canela, y entre la última exposición de canela contra la primera de fresa. Por lo que los datos sugieren que los ratones transgénicos tienen una deficiencia olfatoria al no poder discriminar entre los olores volátiles.

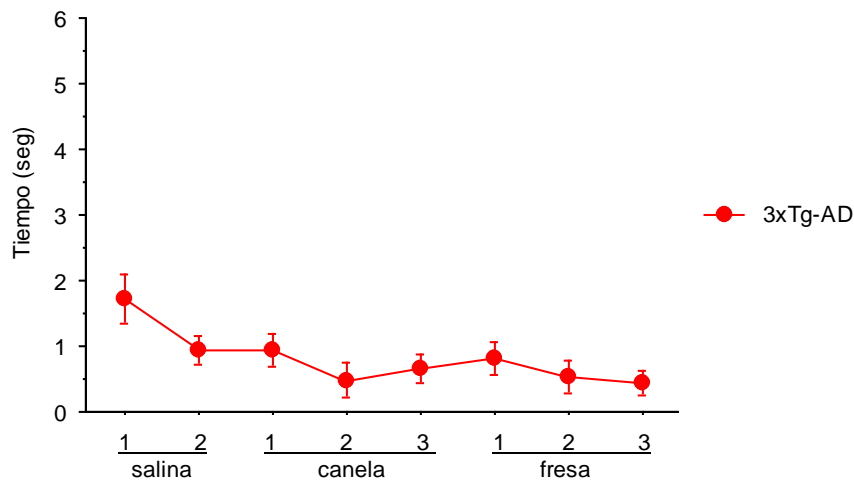


Figura 38. Discriminación olfatoria de ratonas 3xTg-AD de 16-18 meses de edad. Las medias y los \pm SEM del tiempo que pasaron las ratonas experimentales en las exposiciones de olores volátiles.

8. DISCUSIÓN

Los resultados de este trabajo responden la hipótesis planteada acerca de que al menos la ratona transgénica para la EA manifiesta un deterioro en la prueba de motivación sexual incentivada a partir de los cuatro y cinco meses como se observan en las figuras 22, 24 y 26. Por otro lado se observó que la motivación sexual en el WT depende de la etapa del ciclo estral en la que se encuentran, como se indican en las figuras 21 y 22, 23 y 24, 25 y 26, lo anterior coincide con lo reportado en los trabajos de Agamo, 2003 en donde se relaciona la respuesta de la conducta olfatoria a los olores sexuales relevantes con la etapa del ciclo estral. En la prueba de motivación sexual el ratón pone a prueba tres de los cinco sentidos: el olfato, la visión y el oído, ya que la ratona experimental no sólo puede oler los olores que secretan los ratones incentivados, sino que también pueden verlos a través de las mallas que tienen cada contenedor externo, y también puede escuchar los sonidos pre-copulatorios que emiten los machos incentivados, por lo que debido a que nuestro interés era saber si en especial el olfato es el que se encuentra alterado en el modelo transgénico para la EA, fue que se realizó la prueba de preferencia olfatoria, la cual sólo está limitada al sentido de la olfacción. Así en este modelo transgénico se encontró una disminución significativa en los olores sexualmente relevantes en la prueba de preferencia olfatoria con referencia al ciclo estral es claro que las ratonas en estro tanto WT y 3xTg-AD juveniles mostraron diferencias significativas en relación con el estadio de anestro (ver figuras 27 y 28), efecto que se repite sólo en el grupo WT a los 10-11 meses figura 30 y es más marcada en las seniles WT en estro en la figura 32. Hasta el momento se conocía que el 3xTg-AD tenía alteraciones en la motivación y preferencia de olores sexualmente relevantes, cuyo sistema encargado de reconocerlos es el órgano vomeronasal. Por lo que era importante evaluar la tarea conductual de discriminación olfatoria a olores volátiles relacionados a alimentos cuyo sistema responsable de detectarlos es el epitelio olfatorio. Así mismo, se encontró que el grupo 3xTg-AD a la edad de 10-11 meses fueron incapaces de discriminar entre olores relacionados a alimentos en este caso en particular a la fresa y la canela (figura 36). Es evidente que los animales seniles WT y 3xTg-AD con la progresión respecto a la edad mostraron menos tiempo de exploración

en las pruebas de discriminación olfatoria como se muestra en las figuras 37 y 38 comparadas con las figuras de la 33 a la 36 en donde el tiempo de exploración fue al doble para los animales de 4 a 5 meses. Cuando se consideró la distancia recorrida y la velocidad de desplazamiento en la prueba de motivación sexual incentiva fueron medidas como un parámetro adicional de la respuesta de estos animales en donde no se encontraron diferencias significativas, lo que nos sugiere que los animales transgénicos no tuviesen una alteración locomotora asociada a la enfermedad a pesar de la avanzada edad, dado que cada ensayo se midió durante 10 minutos y los animales fueron capaces de recorrer en promedio entre 5 km y 4 km respectivamente, sin embargo no se encontraron diferencias significativas por las desviaciones estándar. (Tablas 1 y 2).

En la literatura se sabe que la disfunción olfatoria se presenta en una etapa temprana de la EA en la que se afecta la habilidad de identificar, reconocer y detectar olores. De hecho es una característica más destacada en los primeros inicios de la EA. Así lo han revelado numerosos experimentos que van desde las primeras pruebas olfatorias relacionados con la EA en la década de los 80's, que revelaron una disminución en la capacidad de discriminación olfatoria a causa de la enfermedad, y han sido de gran utilidad con la finalidad de detectar la patología antes de la manifestación de otros síntomas clínicos característicos del Alzheimer (Serby et al., 1996).

La capacidad de diferenciar el rendimiento de memoria olfativa de acuerdo a la EA temprana se ha investigado y han descubierto un deterioro en la identificación del olor en comparación con sus homólogos controles. La influencia genética de la apolipoproteína $\epsilon 4$ sobre el olfato ha sido examinada y se ha encontrado un deterioro en la detección e identificación de olores. Por lo que también, se ha propuesto que esta disminución se deba por la degeneración detectada en la región entorrinal en particular del hipocampo y la corteza orbital frontal y de ciertas áreas de asociación del neocortex, lo cual interrumpe la transferencia de la información del olfato lo que da lugar a un deterioro de la memoria olfativa. Por lo que se sugiere que estas afectaciones también pudieran estar presentes en los 3xTg-AD en vista de los resultados obtenidos en este

trabajo. Por lo tanto, el uso de pruebas olfatorias contrarrestadas por pruebas cognitivas pueden servir de diagnóstico, particularmente si estos se miden a individuos en situación de riesgo para desarrollar la EA (Handley, et al., 2006).

Hasta este trabajo, en la literatura no se había reportado un estudio cronológico con respecto a los olores sexualmente relevantes y los olores volátiles en el ratón transgénico 3xTg-AD. Sólo se tenía conocimiento del trabajo reportado por Cassano, 2011 quien identificó un deterioro olfatorio en el 3xTg-AD a los 18 meses de edad, además que anteriormente se había observado la presencia de la agregación de amiloide en el bulbo olfatorio mediante Western-blot (Oddo, et. al. 2003), lo cual sugería podría estar afectado sin embargo, no se había hecho un estudio minucioso acerca de la alteración conductual de las diferentes estructuras que procesan los olores a los alimentos y los olores sexualmente relevantes en distintas etapas de su ciclo estral, por ello la importancia y la originalidad de este trabajo.

Como se había discutido en los antecedentes, se sabe que en humanos el primer sentido que se pierde con esta patología es la olfacción y en este modelo transgénico, a reserva de ampliar el número de pruebas y la precisión de las mismas, se sugiere que esto también se cumple. Lo anterior es relevante ya que este modelo puede ser de gran utilidad para probar diferentes estrategias terapéuticas con el fin de revertir las alteraciones presentes en esta patología de tipo demencial.

Como se había discutido previamente, existen numerosas alteraciones morfológicas que se han descrito en la vía olfatoria en la EA. Distintos autores han reportado la presencia de un número moderado de MNFs y de algunas placas seniles en el tracto olfatorio y en el núcleo anterior olfatorio. Por otro lado, los estudios neuroquímicos indican que la actividad de la acetiltransferasa colina se encuentra disminuida en los tubérculos olfatorios en sujetos con EA. Estas observaciones junto con las alteraciones morfológicas descritas en los antecedentes, respaldan la hipótesis de que la vía olfatoria es el sitio temprano de daño en el Alzheimer (Mann et al., 1988, Samudralwar et al., 1995). Por lo anterior, se sugiere realizar estudios histológicos en los ratones 3xTg-AD con la finalidad de comprobar si las alteraciones conductuales

descritas en este trabajo, son debidas a la acumulación de A β y a las MNFs en las diferentes zonas involucradas en la vía olfatoria.

Finalmente, es importante recordar que hoy en día, la enfermedad sólo puede ser confirmada en su totalidad a través de los estudios *post mortem*, por ello se necesitan obtener más estrategias para el diagnóstico de la EA con la finalidad de evaluar apropiadamente al paciente e intervenir clínicamente al sujeto (Schiffman et al., 2001).

9. CONCLUSIONES

Los datos obtenidos en este proyecto sugieren que las ratonas 3xTg-AD presentan alteraciones en su motivación sexual a partir de los 4-5 meses de edad al no pasar más tiempo con el macho incentivo, pese a que estuvieran en una etapa de receptividad de su ciclo estral. También se comprobó que estas mismas ratonas receptoras tienen un deterioro en su preferencia olfatoria para los olores sexualmente relevantes a partir de los 10-11 meses de edad., misma edad en la que también muestran una alteración en la discriminación olfatoria para los olores volátiles relacionados con alimentos. Por último se demostró que las ratonas WT y 3xTg-AD no presentaron problemas de locomoción ni de lateralización al momento de realizar las tareas conductuales.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Acosta-Baena N, Sepulveda-Falla D, Lopera-Gómez CM, Jaramillo-Elorza MC, Moreno S, Aguirre-Acevedo DC, Saldarriaga A, Lopera F. 2011. Pre-dementia clinical stages in presenilin 1 E280A familial early-onset Alzheimer's disease: a retrospective cohort study. *10*, 213-220.
- Aguzzi A, O'Connor T. Protein aggregation diseases: pathogenicity and therapeutic perspectives. *Nat. Rev. Drug Discov.* 9, 237-248.
- Arnold SE, Lee EB, Moberg PJ, Stutzbach L, Kazi H, Han LY, Lee VMY, Trojanowski JQ. 2010. Olfactory epithelium amyloid- β and paired helical filament-tau pathology in Alzheimer's disease. *Ann Neurol.* 67, 462-469.
- Averback P. 1983. Two new lesions in Alzheimer's disease. *Lancet.* 2, 1203.
- Axel R. 1995. The molecular logic of smell. *273*, 154-159.
- Ballard C, Gauthier S, Corbett A, Brayne C, Aarsland D, Jones E. 2011. Alzheimer's disease. *Lancet.* 377, 1019-1031.
- Bar-Am O, Weinreb O, Amit T, Youdim MB. 2005. Regulation of Bcl-2 family proteins, neurotrophic factors, and APP processing in the neurorescue activity of propargylamine. *J FASEB.* 19, 1899-1901.
- Behrens PM, Vergara EF. 2007. One hundred years of Alzheimer's disease: immunotherapy a hope?. *Rev. Med. Chil.* 135, 103-110.
- Bédard A, Parent A. 2004. Evidence of newly generated neurons in the human olfactory bulb. *Develop Brain Res.* 151, 159-168.
- Bilbul M, Schipper HM. 2011. Risk profiles of Alzheimer disease. *Can J Neurol Sci.* 38, 580-592.
- Bitan G, Kirkitadze MD, Lomakin A, Vollers SS, Benedek GB, Teplow DB. 2003. Amyloid beta -protein (A β) assembly: A β 40 and A β 42 oligomerize through distinct pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 100, 330-335.
- Bojarski L, Herms J, Kuznicki J. 2007. Calcium dysregulation in Alzheimer's disease. *Neurochem Int.* 52, 621-633.
- Buck L. 2000. The molecular architecture of odor and pheromone sensing in mammals. *Cell.* 100, 611-618.

- Butterfield DA, Castegna A, Lauderback CM, Drake J. 2002. Evidence that amyloid beta-peptide-induced lipid peroxidation and its sequelae in Alzheimer's disease brain contribute to neuronal death. *Neurobiology of Aging*. 23, 655-664.
- Caccamo A, Oddo S, Sugarman MC, Akbari Y, LaFerla FM. 2005. Age- and region-dependent alterations in Abeta-degrading enzymes: implications for Abeta-induced disorders. *Neurobiol Aging*. 26, 645-654.
- Calhoun-Haney R, Murphy C. 2005. Apolipoprotein $\epsilon 4$ is associated with more rapid decline in odor identification than in odor threshold or dementia rating scale scores. *Brain and Cogn*. 58, 178-182.
- Carter MD, Simms GA, Weaver DF. 2010. The development of new therapeutics for Alzheimer's disease. *Clin Pharm Therap*. 4 475-486.
- Cassano T, Romano A, Macheda T, Colangeli R, Cimmino CS, Petrella A, La-Ferla FM, Cuomo V, Gaetani S. 2011. Olfactory memory is impaired in a triple transgenic model of Alzheimer disease. *Behav Brain Res*. 224, 408-412.
- Caughey B, Lansbury PT. 2003. Protofibrils, pores, fibrils, and neurodegeneration: separating the responsible protein aggregates from the innocent bystanders. *Annu. Rev. Neuroscience*. 26, 267-298.
- Ciprian
- Citron M. 2004. Strategies for disease modification in Alzheimer's disease. *Nat. Rev. Neuroscience*. 5, 677-685.
- Citron M. 2010. Alzheimer's disease: strategies for disease modification. *Nat. Rev*. 9, 387-398.
- Clarris HJ, Key B, Beyreuther K, Masters CL, Small DH. 1995. Expression of the amyloid protein precursor as Alzheimer's disease in the developing rat olfactory system. *Dev Brain Res*. 88, 87-95.
- Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses AD, Haines JL, Pericak-Vance MA. 1993. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science*. 261, 921-923.
- Craig MC, Murphy DGM. 2010. Estrogen therapy and Alzheimer's dementia. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1205, 245-253.

- Crowther DC, Kinghorn KJ, Page R, Lomas DA. 2004. Therapeutic targets from a *Drosophila* model of Alzheimer's disease. *C Op in Pharm.* 4, 513-516.
- Dahlgren KN, Manelli AM, Stine WB, Jr., Baker LK, Krafft GA, LaDu MJ. 2002. Oligomeric and fibrillar species of amyloid-beta peptides differentially affect neuronal viability. *J. Biol. Chem.* 277, 32046-32053.
- De Felice FG, Velasco PT, Lambert MP, Viola K, Fernandez SJ, Ferreira ST, Klein WL. 2007. Abeta oligomers induce neuronal oxidative stress through an N-methyl-D-aspartate receptor-dependent mechanism that is blocked by the Alzheimer drug memantine. *J. Biol. Chem.* 282, 11590-11601.
- Durand M, Coronas V, Jourdan F, Quirion R. 1998. Developmental and aging aspects of the cholinergic innervation of the olfactory bulb. *Int. J. Devl Neuroscience.* 16, 777-785.
- Esiri MM, Wilcock GK. 1984. The olfactory bulbs in Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 47, 56-60.
- Ferri CP, Prince M, Brayne C, Brodaty H, Fratiglioni L, Ganguli M, Hall K, Hasegawa K, Hendrie H, Huang Y, Jorm A, Mathers C, Menezes PR, Rimmer E, Sczufca M. 2005. Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet.* 366, 2112-2117.
- Fillenbaum GG, van Belle G, Morris JC, Mohs RC, Mirra SS, Davis PC, Tariot PN, Silverman JM, Clark CM, Welsh-Bohmer KA, Heyman A. 2008. Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD): the first twenty years. *Alzheimers Dement.* 4, 96-109.
- Firesten S. 2001. How the olfactory system sens of scents. *Nat. Rev.* 413, 211-218.
- Getchell ML, Shah DS, Buch SK, Davis DG, Getchell TV. 2002. 3-Nitrotyrosine immunoreactivity in olfactory receptors neurons of patients with Alzheimer's disease: implications for impaired odor sensitivity. *Nuerobiol of Aging.* 24, 663-673.
- Girones X, Guimera A, Cruz-Sanchez FF. 2002. Alzheimer disease. *Rev Fac Cien Med Univ Nac Cordoba.* 59, 13-38.
- Goedert M, Spillantini MG. 2006. A century of Alzheimer's disease. *Science.* 314, 777-781.

- Gotz J, Chen F, Barmettler R, Nitsch RM. 2001. Tau filament formation in transgenic mice expressing P301L tau. *J Biol. Chem.* 276, 529-534.
- Gyure KA, Durham R, Stewart WF, Smialek JE, Troncoso JC. 2001. Intraneuronal abeta-amyloid precedes development of amyloid plaques in Down syndrome. *Arch Pathol Lab Med.* 125, 489-492.
- Haass C, Selkoe DJ. 2007. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8,101-112.
- Halliwell B. 1992. Reactive Oxygen Species and the Central-Nervous-System. *Journal of Neurochemistry.* 59, 1609-1623.
- Halpern M, Martínez-Marcos A. 2003. Structure and function of the vomeronasal system: an update. *Prog Neurobiol.* 70, 245-318.
- Handley OJ, Morrison CM, Miles C, Bayer AJ. 2006. ApoE gene and familiar risk of Alzheimer's disease as predictors of odour identification in older adults. *Neurobiol of Aging.* 27, 1425-1430.
- He X, Huang Y, Li B, Gong CX, Schuchman EH. 2010. Deregulation of sphingolipid metabolism in Alzheimer's disease. *31*, 398-408.
- Hellstrom-Lindahl E, Ravid R, Nordberg A. 2008. Age-dependent decline of neprilysin in Alzheimer's disease and normal brain: inverse correlation with A beta levels. *Neurobiol Aging.* 29, 210-221.
- Higuchi M, Iwata N, Matsuba Y, Sato K, Sasamoto K, Saido TC. 2005. 19F and 1H MRI detection of amyloid beta plaques in vivo. *Nat Neuroscience.* 8, 527-533.
- Jankowsky JL, Fadale DJ, Anderson J, Xu GM, Gonzales V, Jenkins NA, Copeland NG, Lee MK, Younkin LH, Wagner SL, Younkin SG, Borchelt DR. 2004. Mutant presenilins specifically elevate the levels of the 42 residue beta-amyloid peptide in vivo: evidence for augmentation of a 42-specific gamma secretase. *Hum Mol Genet.* 13, 159-170.
- Katz B, Rimmer S, Iragui V, Katzman R. 1989. Abnormal pattern electroretinogram in Alzheimer's disease: evidence for retinal ganglion cell degeneration?. *Ann. Neurol.* 26, 221-225.

- Krüger J, Moilanen V, Majamaa K, Remes AM. 2011. Molecular genetic analysis of the APP, PSEN1, and PSEN2 genes in Finnish patients with early-onset Alzheimer disease and frontotemporal lobar degeneration. *Alzheimer Dis Assoc Disord*.
- Klunk WE, Engler H, Nordberg A, Wang Y, Blomqvist G, Holt DP, Bergstrom M, Savitcheva I, Huang GF, Estrada S, Ausen B, Debnath ML, Barletta J, Price JC, Sandell J, Lopresti BJ, Wall A, Koivisto P, Antoni G, Mathis CA, Langstrom B. 2004. Imaging brain amyloid in Alzheimer's disease with Pittsburgh Compound-B. *Ann Neurol*. 55, 306-319.
- Kulkarni-Narla A, Getchell TV, Schmitt FA, Getchell ML. 1996. Manganese and copper-zinc superoxide dismutases in the human olfactory mucosa: increased immunoreactivity in Alzheimer's disease. *Exp Neurol*. 140, 115-125.
- LaFerla FM, Green KN, Oddo S. 2007. Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neuroscience* 8, 499-509.
- LaFerla FM. 2010. Pathways linking A β and tau pathologies. *Biochem. Soc. Trans.* 38, 993-995.
- Lau JC, Lerch JP, Sled JG, Henkelman RM, Evans AC, Bedell BJ. 2008. Longitudinal neuroanatomical changes determined by deformation-based morphometry in a mouse model of Alzheimer's disease. *NeuroImage*. 42, 19-27.
- Lee JH, Goedert M, Hill WD, Lee VM, Trojanowski JQ. 1993. Tau proteins are abnormally expressed in olfactory epithelium of Alzheimer patients and developmentally regulated in human fetal spinal cord. *Exp Neuro*. 121, 93-105.
- Lehman EJH, Kulnane LS, Lamb BT. 2003. Alterations in β -amyloid production and deposition in brain regions of two transgenic models. *Neurobiol of Aging*. 24, 645-653.
- Lesne S, Koh MT, Kotilinek L, Kaye R, Glabe CG, Yang A, Gallagher M, Ashe KH. 2006. A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory. *Nature*. 440, 352-357.
- Loopuijt LD, Sebens JB. 1990. Loss of dopamine receptors in the olfactory bulb of patients with Alzheimer's disease. *Brain Res*. 529, 239-244.

- Maczurek A, Hager K, Kenklies M, Sharman M, Martins R, Engel J, Carlson D, Münch G. 2008. Lipoic acid as anti-inflammatory and neuroprotective treatment for Alzheimer's disease. *Adv Drug Deliv Rev.* 60, 1463-1470.
- Mandelkow EM, Stamer K, Vogel R, Thies E, Mandelkow E. 2003. Clogging of axons by tau, inhibition of axonal traffic and starvation of synapses. *Neurobiol. Aging.* 24, 1079-1085.
- Mann DM, Tucker CM, Yates PO. 1988. Alzheimer's disease: an olfactory connection? *Mech Ageing Dev.* 42, 1-15.
- Martínez-García F, Agustín-Pavon C, Martínez-Hernández J, Martínez-Ricós J, Moya-Serés M, Novejarque A, Lanuza E. 2011. ¿Por qué dos sistemas olfatorios? Feromonas, olores, atracción sexual y aprendizaje. *La olfacción en España.* Cap 1.
- Martins IC, Kuperstein I, Wilkinson H, Maes E, Vanbrabant M, Jonckheere W, Van Gelder P, Hartmann D, D'Hooge R, De Strooper B, Schymkowitz J, Rousseau F. 2008. Lipids revert inert Abeta amyloid fibrils to neurotoxic protofibrils that affect learning in mice. *J EMBO.* 27, 224-233.
- Martins RN, Turner BA, Carroll RT, Sweeney D, Kim KS, Wisniewski HM, Blass JP, Gibson GE, Gandy S. 1995. High levels of amyloid-beta protein from S182 (Glu246) familial Alzheimer's cells. *Neuroreport.* 7, 217-220.
- Mattson MP. 2004. Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature.* 430, 631-639.
- Mayeux R. 2003. Epidemiology of neurodegeneration. *Annu Rev Neuroscience.* 26, 81-104.
- McLaughlin NCR, Westervelt HJ. 2007. Odor identification deficits in frontotemporal dementia: A preliminary study. *Arch of Clin Neurophysy.* 23, 119-123.
- Moberg PJ, Doty RL, Mahr RN, Meshulam RI, Arnold SE, Turetsky BI, Gur RE. 1997. Olfactory identification in elderly schizophrenia and Alzheimer's disease. *Neurobiol of Aging.* 18, 163-167.
- Morgan D, Diamond DM, Gottschall PE, Ugen KE, Dickey C, Hardy J, Duff K, Jantzen P, DiCarlo G, Wilcock D, Connor K, Hatcher J, Hope C, Gordon M, Arendash GW.

200. A beta peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimer's disease. *Nature*. 408, 982-985.
- Mori K, Nagao H, Yoshihara Y. The olfactory bulb: coding and processing of odor molecule information. *Science*. 286, 711-715.
- Näslund J, Haroutunian V, Mohs R, Davis KL, Davies P, Greengard P, Buxbaum JD. 2000. Correlation between elevated levels of amyloid beta-peptide in the brain and cognitive decline. *JAMA*. 283, 1571-1577.
- Nilsen J, Chen S, Irwin RW, Iwamoto S, Brinton RD. 2006. Estrogen protects neuronal cells from amyloid beta-induced apoptosis via regulation of mitochondrial proteins and function. *BMC Neuroscience*. 7, 74.
- Nordberg A. 2004. PET imaging of amyloid in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol*. 3, 519-527.
- Nordin S, Murphy C. 1996. Impaired sensory and cognitive olfactory function in questionable Alzheimer's disease. *Neuropsych*. 10, 113-119.
- Nunan J, Small DH. 2000. Regulation of APP cleavage by alpha-, beta- and gamma-secretases. *FEBS Lett*. 483, 6-10.
- Nussbaum RL, Ellis CE. 2003. Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *N. Engl. J. Med*. 348, 1356-1364.
- Oddo S, Caccamo A, Kitazawa M, Tseng BP, LaFerla FM. 2003a. Amyloid deposition precedes tangle formation in a triple transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 24, 1063-1070.
- Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kaye R, Metherate R, Mattson MP, Akbari Y, LaFerla FM. 2003b. Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. *Neuron*. 39, 409-421.
- Palop JJ, Chin J, Mucke L. 2006. A network dysfunction perspective on neurodegenerative diseases. *Nature*. 443, 768-773.
- Paredes RG, Larriva-Sahd J. 2010. Medullary neurons in the core white matter of the olfactory bulb: a new cell type. *Cell Tissue Res*. 339, 281-295.

- Parrish-Aungst S, Shipley MT, Erdelyi F, Szabo G, Puche AC. 2007. Quantitative analysis of neuronal diversity in the mouse olfactory bulb. *Jou of Comp Neu.* 501, 825-836.
- Perez SE, Dar S, Ikonovic MD, DeKosky ST, Mufson EJ. 2007. Cholinergic forebrain degeneration in the APP^{swe}/PS1^{DeltaE9} transgenic mouse. *Neurobiol Dis.* 28, 3-15.
- Petit D, Gagnon JF, Fantini ML, Ferini-Strambi L, Montplaisir J. 2004. Sleep and quantitative EEG in neurodegenerative disorders. *J Psychosom Res.* 56, 487-496.
- Piacentini R, Ripoli C, Leone L, Misti F, Clementi ME, D'Ascenzo M, Giardina B, Azzena GB, Grassi C. 2008. Role of methionine 35 in the intracellular Ca²⁺ homeostasis dysregulation and Ca²⁺ dependent apoptosis induced by amyloid beta-peptide in human neuroblastoma IMR32 cells. *J Neurochem.* 107, 1070-1082.
- Plant LD, Boyle JP, Smith IF, Peers C, Pearson HA. 2003. The production of amyloid beta peptide is a critical requirement for the viability of central neurons. *J Neurosci.* 23, 5531-5535.
- Pratico D, Uryu K, Leight S, Trojanowski JQ, Lee VMY. 2001. Increased lipid peroxidation precedes amyloid plaque formation in an animal model of Alzheimer amyloidosis. *Journal of Neuroscience.* 21, 4183-4187.
- Quinn JF, Bussiere JR, Hammong RS, Montine TJ, Henson E, Jones RE, Stackman Jr RW. 2007. Chronic dietary α -lipoic acid reduces deficits in hippocampal memory of aged Tg2576 mice. *Neurobiol Aging.* 28, 213-225.
- Reed RR. 1992. Signaling pathways in odorant detection. *Neuron.* 8, 205-209.
- Rogaeva E, Meng Y, Lee JH, Gu Y, Kawarai T, Zou F, Katayama T, Baldwin CT, Cheng R, Hasegawa H, Chen F, Shibata N, Lunetta KL, Pardossi-Piquard R, Bohm C, Wakutani Y, Cupples LA, Cuenco KT, Green RC, Pinessi L, Rainero I, Sorbi S, Bruni A, Duara R, Friedland RP, Inzelberg R, Hampe W, Bujo H, Song YQ, Andersen OM, Willnow TE, Graff-Radford N, Petersen RC, Dickson D, Der SD, Fraser PE, Schmitt-Ulms G, Younkin S, Mayeux R, Farrer LA, Goerge-Hyslop P.

2007. The neuronal sotilin-related receptor SORL1 is genetically associated with Alzheimer disease. *Nat Genet.* 39, 168-177.
- Rogawski MA, Wenk GL. 2003. The neuropharmacological basis for the use of memantine in the treatment of Alzheimer's disease. *CNS Drug Rev.* 9, 275-308.
- Saiz-Sanchez D, Ubeda-Bañon I, de la Rosa-Prieto C, Argandoña-Palacios L, Garcia-Muñozguren S, Insausti R, Martinez-Marcos A. 2009. Somatostatin, tau and β -amyloid within the anterior olfactory nucleus in Alzheimer disease. *Exp Neurol.* 223, 347-350.
- Samudralwar DL, Diprete CC, Ni BF, Ehmann WD, Markesbery WR. 1995. Elemental imbalances in the olfactory pathway in Alzheimer's disease. *Jou Neurol Sci.* 130, 139-145.
- Scalia F, Gallousis G, Roca S. 1991. The differential projections of the main and accessory olfactory bulb in the frog. *J Comp Neurol.* 305, 443-461.
- Schenk D, Barbour R, Dunn W, Gordon G, Grajeda H, Guido T, Hu K, Huang J, Johnson-Wood K, Khan K, Kholodenko D, Lee M, Liao Z, Lieberburg I, Motter R, Mutter L, Soriano F, Shopp G, Vasquez N, Vandeventer C, Walker S, Wogulis M, Yednock T, Games D, Seubert P. 1999. Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature.* 400, 173-177.
- Schepered GM. 1994. *Neurobiology.* Oxford University Press.
- Schiffman S. 1983. Taste and smell in disease. *N Engl J Med.* 308, 1275-1279.
- Schiffman SS, Graham BG, Sattely-Miller EA, Zervakis, Welsh-Bohmer K. 2001. Taste, smell and neuropsychological performance of individuals at familial risk for Alzheimer's disease. *Neurobiol of Aging.* 23, 397-404.
- Schmechel DE, Saunders AM, Strittmatter WJ, Crain BJ, Hulette CM, Joo SH. 1993. Increased amyloid β -peptide deposition in cerebral cortex as a consequence of apolipoprotein E genotype in late-onset Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA.* 90, 9649-9653.
- Selden N, Mesulam MM, Geula C. 1994. Human striatum: the distribution of neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Brain Res.* 648, 327-331.

- Serby M, Mohan C, Aryan M, Williams L, Mohs RC, Davis KL. 1996. Olfactory identification deficits in relatives of Alzheimer's disease patients. *Biol Psych.* 39, 375-377.
- Siedlak LS, Casadesus G, Webber MK, Pappolla AM, Atwood SC, Smith AM, Perry G. 2009. Chronic antioxidant therapy reduces oxidative stress in a mouse model of Alzheimer's disease. *Free Radic Res.* 43, 156-164.
- Simpson J, Yates CM, Gordon A, St Clair DM. 1984. Olfactory tubercle choline acetyltransferase activity in Alzheimer-type dementia, Down's syndrome and Huntington's chorea. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 47, 1138-1139.
- Smith MA, Rottkamp CA, Nunomura A, Raina AK, Perry G. 2000. Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Bba-Mol Basis Dis.* 1502, 139-144.
- St George-Hyslop PH, Petit A. 2005. Molecular biology and genetics of Alzheimer's disease. *C R Biol.* 328, 119-130.
- Sterniczuk R, Dyck RH, LaFerla FM, Antle MC. 2010. Characterization of the 3xTg-AD mouse model of Alzheimer's disease: Part 1. Circadian changes. *Brain Res.* 1348, 139-148.
- Takahashi RH, Milner TA, Li F, Nam EE, Edgar MA, Yamaguchi H, Beal MF, Xu H, Greengard P, Gouras GK. 2002. Intraneuronal Alzheimer abeta42 accumulates in multivesicular bodies and is associated with synaptic pathology. *Am J Pathol.* 161, 1869-1879.
- Talamo BR, Rudel RA, Kosik KS, Lee VM, Neff S, Adelman L, Kauer JS. 1989. Pathological changes in olfactory neurons in patients with Alzheimer's disease. *Nature.* 337, 736-739.
- Thommann PA, Santos V, Toro P, Schönknecht P, Essig M, Schröder J. 2009. Reduced olfactory bulb and tract volume in early Alzheimer's disease-A MRI study. *Neurobiol of Aging.* 30, 838-841.
- Tirindelli R, Mucignat-Caretta C, Ryba NJP. 1998. Molecular aspects of pheromonal communication via the vomeronasal organ of mammals. *Trends Neurosci.* 21, 482-486.
- Vasilevko V, Cribbs DH. 2006. Novel approaches for immunotherapeutic intervention in Alzheimer's disease. *Neurochem Int.* 49, 113-126.

- Walsh DM, Hartley DM, Kusumoto Y, Fezoui Y, Condron MM, Lomakin A, Benedek GB, Selkoe DJ, Teplow DB. 1999. Amyloid beta-protein fibrillogenesis. Structure and biological activity of protofibrillar intermediates. *J Biol Chem.* 274, 25945-25952.
- Walsh DM, Selkoe DJ. 2007. A beta oligomers - a decade of discovery. *J Neurochem.* 101, 1172-1184.
- Wang QS, Tian L, Huang YL, Qin S, He LQ, Zhou JN. 2002. Olfactory identification and apolipoprotein E ϵ 4 allele in mild cognitive impairment. *Brain Res.* 951. 77-81.
- Warner MD, Peabody CA, Flattery JJ, Tinklenberg JR. 1986. Olfactory deficits and Alzheimer's disease. *Biol. Psychiatry.* 21, 116-118.
- Wesson DW, Wilson DA. 2010. Smelling sounds: olfactory-auditory sensory convergence in the olfactory tubercle. *J Neurosci.* 30, 3013-3021.
- Wolfe MS. 2002. Therapeutic strategies for Alzheimer's disease. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 1, 859-866.
- Yan SD, Yan SF, Chen X, Fu J, Chen M, Kuppusamy P, Smith MA, Perry G, Godman GC, Nawroth P, Zweiter JL, Stern D. 1995. Nonenzymatically Glycated-Tau in Alzheimers-Disease Induces Neuronal Oxidant Stress Resulting in Cytokine Gene-Expression and Release of Amyloid Beta-Peptide. *Nature Medicine.* 1, 693-699.
- Yasojima K, McGeer EG, McGeer PL. 2001. Relationship between beta amyloid peptide generating molecules and neprilysin in Alzheimer disease and normal brain. *Brain Res.* 919, 115-121.
- Younkin SG. 1998. The role of A beta 42 in Alzheimer's disease. *J Physiol. Paris.* 92, 289-292.
-

11. FIGURAS

Figura 1.- Dr. Emil Kraepelin y Dr. Alois Alzheimer	3
Figura 2.- Proteólisis de la proteína precursora de amiloide (APP)	7
Figura 3.- Hipótesis de la cascada amiloide	10
Figura 4.- Patología de la tau	11
Figura 5.- Neuroimagen de un paciente con la EA y una persona sana	12
Figura 6.- Terapias para combatir la EA	14
Figura 7.- Esquema sagital del bulbo olfatorio humano	18
Figura 8.- Áreas allocorticales olfatorias	19
Figura 9.- Sistema olfatorio en roedores	20
Figura 10.- Resultados de la prueba de identificación de olores	22
Figura 11.- Bulbo olfatorio de una paciente de 83 años de edad con EA	22
Figura 12.- Epitelio olfatorio de un enfermo de EA	23
Figura 13.- Diagrama que representa la expresión temporal y espacial de la APP en el desarrollo del sistema olfatorio de la rata	24
Figura 14.- Escáner de corte coronal T1 con MRI de bulbos olfatorios de un paciente con EA	26
Figura 15.- Epitelios olfatorios de una persona de 84 años de edad con la EA	26
Figura 16.- Tres ejemplos de ratones transgénicos para la APP, la PS1 y la TAU	28
Figura 17.- Esquema de la generación del ratón Triple Transgénico (3xTg-AD)	29
Figura 18.- Prueba de motivación sexual incentiva	33
Figura 19.- Prueba de preferencia olfatoria	34
Figura 20.- Prueba de discriminación olfatoria a olores relacionados a alimentos.	35
Figura 21.- Motivación sexual incentiva de ratonas de 4-5 meses de edad en anestro	38
Figura 22.- Motivación sexual incentiva de ratonas de 4-5 meses de edad en estro	39
Figura 23.- Motivación sexual incentiva de ratonas de 10-11 meses de	

edad en anestro	40
Figura 24.- Motivación sexual inducida de ratonas de 10-11 meses de edad en estro	41
Figura 25.- Motivación sexual incentiva de ratonas de 16-18 meses de edad anestro	42
Figura 26.- Motivación sexual inducida de ratonas de 16-18 meses de edad en estro	42
Figura 27.- Preferencia olfatoria de ratonas de 4-5 meses de edad en anestro	43
Figura 28.- Preferencia olfatoria de ratonas de 4-5 meses de edad en estro	44
Figura 29.- Preferencia olfatoria de ratonas de 10-11 meses de edad en anestro	45
Figura 30.- Preferencia olfatoria de ratonas de 10-11 meses de edad en estro	45
Figura 31.- Preferencia olfatoria de ratonas de 16-18 meses de edad en anestro	46
Figura 32.- Preferencia olfatoria de ratonas de 16-18 meses de edad en estro	47
Figura 33.- Discriminación olfatoria de ratonas WT de 4-5 meses de edad	48
Figura 34.- Discriminación olfatoria de ratonas 3xTg-AD de 4-5 meses de edad	49
Figura 35.- Discriminación olfatoria de ratonas WT de 10-11 meses de edad	49
Figura 36.- Discriminación olfatoria de ratonas 3xTg-AD de 10-11 meses de edad	50
Figura 37.- Discriminación olfatoria de ratonas WT de 16-18 meses de edad	51
Figura 38.- Discriminación olfatoria de ratonas 3xTg-AD de 16-18 meses de edad	51

12. Tablas

Tabla 1.- Datos obtenidos de la distancia recorrida y la velocidad de desplazamiento en las ratonas experimentales	37
Tabla 2.- Registro del total del tiempo en los compartimientos vacíos	37