



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

COBRE LIBRE Y UNIDO A PROTEÍNA EN HIPOCAMPO DEL 3xTg-AD: RELACIÓN
CON SUPERÓXIDO DISMUTASA Y TAREAS CONDUCTUALES

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:

ANA ELENA CASTRO TRON

TUTOR:

DRA. SOFÍA YOLANDA DÍAZ MIRANDA
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

COMITÉ TUTOR:

DR. MAURICIO DÍAZ MUÑOZ
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

DRA. Ma. DE LOS ÁNGELES ARACELI DÍAZ RUIZ
INSTITUTO DE NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIURGÍA

JURIQUILLA, QUERÉTARO. JUNIO DEL 2017.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

FIRMAS

Los miembros del Jurado de Examen certificamos que la tesis elaborada por: Ana Elena Castro Tron, cuyo título es: “Cobre libre y unido a proteína en hipocampo del 3xTg-AD: relación con superóxido dismutasa y tareas conductuales” 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

Dr. Roberto Agustín Prado Alcalá

Secretaria (Tutora)

Dra. Sofía Yolanda Díaz Miranda

Vocal

Dra. Liliana Quintanar Vera

Suplente

Dr. Mauricio Díaz Muñoz

Suplente

Dr. Manuel Benigno Aguilar Ramírez

Aprobado por el Comité Académico

Coordinadora del Programa

Dra. Maricela Luna Muñoz

RESUMEN

La enfermedad neurodegenerativa de Alzheimer (EA) se caracteriza por la pérdida de capacidades cognitivas y deficiencias en la memoria. Una de las áreas cerebrales que se ve afectada en las primeras etapas de esta enfermedad es el hipocampo, estructura plástica cerebral que regula conductas innatas como la anidación, así como la memoria de reconocimiento de objetos por ubicación (ROU). En el humano, se ha propuesto como posible diagnóstico de la EA la detección de la fracción de Cu libre en suero, dado que en estudios *post mortem*, ésta se encuentra alterada. Por lo tanto, es importante determinar este desbalance en el cerebro de un modelo murino como el 3xTg-AD, que modela la enfermedad humana con pérdida de la capacidad cognitiva. Por ello, la diferenciación de la fracción de Cu libre y unido a proteínas en el hipocampo del 3xTg-AD y su relación con el desempeño conductual permitirá validar la hipótesis de un diagnóstico temprano, por medio de la detección de la fracción de Cu libre en suero. En cuanto a la relación del Cu con el estrés oxidativo asociado a la EA; se espera observar un desbalance en la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD), que lo requiere como cofactor para su función de reducción del ion superóxido. Entonces, se pretende relacionarla, también, con las conductas de anidación y ROU. Para lograr esto se estudiaron las conductas antes mencionadas, se usó espectrofotometría de absorción atómica junto con la medición de la actividad de SOD siguiendo la metodología de Fridovich. Así, los resultados muestran que la plasticidad funcional del hipocampo se preserva en el 3xTg-AD en etapas asintomáticas no así cuando avanza la EA y se confirma por el aumento temprano la actividad de SOD y el aumento de la fracción de Cu libre. En consecuencia, este modelo de Alzheimer valida por una parte la alteración en la SOD y la cantidad del Cu unido a proteínas, ambos eventos exacerbados por la edad en el modelo 3xTg-AD.

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disorder characterized by loss cognitive abilities and memory deficit. One of the main cerebral areas affected in the early stages of AD is the hippocampus which is a highly plastic structure that regulates innate behaviours such as nesting as well as object location memory (OLM). Free Cu detection has been proposed as a possible diagnostic since in *post-mortem* studies, this is altered. Therefore, it is important to evaluate Cu dyshomeostasis in the brain of the murine model such as 3xTg-AD, which mimics AD along with loss of cognitive abilities. Hence, free and bounded Cu measurement, differentiation of both fractions and its relationship with cognitive performance may support the hypothesis of an early AD diagnostic in serum. Regarding the role of Cu and the oxidative stress associated with AD, it is the enzyme superoxide dismutase (SOD) which requires it as a cofactor for superoxide ions reduction, thus an imbalance in SOD activity, related with these behaviours, nesting and OL. To achieve this we studied the behavioural tests mentioned above, also we used atomic absorption spectrophotometry along with the Fridovich's method for the measurement of SOD activity. Therefore, the results show that the functional plasticity of the hippocampus is preserved in the 3xTg-AD model in asymptomatic phase as opposed to the progress of the pathology; this is supported by the early augmentation of SOD activity and the increase in the amount of free Cu. In consequence, the AD model is supported by the alteration of SOD activity and the amount of bounded copper, both phenomena exacerbated by age in the 3xTg-AD mice.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y al Instituto de Neurobiología Campus UNAM-Juriquilla por brindarme la oportunidad de realizar la Maestría en Ciencias (Neurobiología).

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por otorgarme la beca que me permitió realizar mis estudios de Maestría (Becario No: 516011024).

A la Dirección General de Apoyo al Personal Académico de la DGAPA-UNAM a través de los proyectos PAPIIT: IN-201613 e IN-203616.

A las Unidades de Apoyo Técnico y Administrativo:

- Bioterio del INB: al M.V.Z. José Martín García Servín y la Dra. Alejandra Castilla León por el cuidado y mantenimiento de los animales requeridos para los experimentos.
- Proteogenómica: a la M. en C. Adriana González Gallardo.
- Posgrado del INB: a la M. en C. Leonor Casanova Rico y Guadalupe Amador Uribe por el apoyo administrativo.
- Videoconferencia del INB: a la Lic. Lourdes Lara Ayala.
- Biblioteca del Campus Juriquilla: a la Lic. Teresa Soledad Medina Malagón y a la Lic. Teresita de Jesús Pérez Cruz por su apoyo técnico y la facilitación del material bibliográfico.
- Cómputo del INB: a la Ing. Sandra Hernández García y el Ing. Omar González Hernández

Lab C-02: A la M. en C. Azucena Ruth Aguilar Vázquez y Jorge Servín de la Cruz por el apoyo técnico recibido.

Lab B-11: A la Dra. Eva Olivia Vázquez Martínez por su apoyo técnico.

Al Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, al Dr. Sergio Montes por su asesoría y a la Dra. Araceli Díaz Ruiz del Departamento de Neuroquímica, por la asesoría académica y el aporte de recursos para la realización del proyecto.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A la Dra. Sofía Díaz por recibirme en su laboratorio con los brazos abiertos y por enseñarme a controlar ese impulso de hablar antes de terminar de escuchar. Gracias por ser mi guía en el mundo de la investigación.

A la M. en C. Azucena Aguilar por acortar esas largas sesiones de trabajo y por estar siempre presta a partir y compartir un pastel.

A la Dra. Araceli Díaz, al Dr. Camilo Ríos y al Dr. Sergio Montes, por su apoyo y guía prestados para la realización de mi tesis.

Al Dr. Mauricio Díaz por sus consejos prácticos y, también, a los integrantes de su laboratorio por recibirme con gusto a la hora de la comida.

A los miembros de mi Jurado de Examen por sus consejos y sugerencias, que enriquecieron mi tesis.

A mi bióloga favorita, Jovana, gracias por su amistad, las noches de baile, aventuras, su ayuda con mi proyecto y los consejos brindados.

A Jesús, por su ayuda con mis dudas de estadística y los chocolates.

A Laura, por recibirme en su casa y guiarme en la ciudad.

A Isaac, Erika y Didis por sus asesorías y consejos.

A mis compañeros de laboratorio, Ana María, Anallely, Isra, Martha y Zyanya, les agradezco esos momentos de risa, seminarios, comidas y su compañía.

A mis amigos y compañeros de generación, Polet, Benjamín, Betty y Tania, por acompañarme desde esas largas y tediosas sesiones de estudio hasta en los momentos difíciles.

A mis amigos hidrocálidos, Ali, Memo, Magda, Nay, Fer, Sherly, Flor, Marilu y Alan Jacob, por estar siempre en las buenas, en las malas y hasta en las peores.

A mis padres: María Elena Tron, por ser siempre mi apoyo más grande, y Jorge H. Castro, por enseñarme a ser perseverante y que el trabajo duro siempre se ve recompensado.

A mis tíos Lupita y Lorenzo, por salvar mi tesis; a Verónica, por su apoyo; y Anita, por recibirme en tu casa; y, a todos, les agradezco sus palabras de aliento.

A Clicerio Ismael por ayudarme con mis problemas técnicos de video y sus correcciones en inglés.

DEDICATORIAS

A mi mamá, María Elena, no sólo por apoyarme sino también porque comparte conmigo la emoción por mis logros y me sostiene cuando creo que no puedo. Gracias por enseñarme a ser fuerte ante la adversidad y por inspirarme a conseguir mis metas. Te quiero mucho.

A mis hermanos, Jorge y Liliana, de quienes aprendo constantemente.

A mi abuelo, Enrique, quien ya no se encuentra aquí pero que me inspiró a adentrarme al mundo de la ciencia.

Y, finalmente, a mi compañero, amigo y pareja, Clicerio Ismael, quien me ha hecho reír, llorar, enojar y emocionarme durante estos dos años; con quien he superado varios obstáculos y de quien también he aprendido mucho. Gracias por tu cariño y apoyo.

ÍNDICE

FIRMAS.....	II
RESUMEN.....	III
ABSTRACT	IV
ÍNDICE	IX
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Alzheimer	3
2.1.1 Historia	3
2.1.2 Epidemiología.....	3
2.1.3 Definición.....	4
2.2 Deterioro cognitivo y modelo murino.....	6
2.2.1 Modelos de ratón para la EA: Aspectos neuropatológicos y cognitivos... 7	
2.2.2 Anidación.....	9
2.2.3 Reconocimiento de objeto por ubicación	9
2.3 Metales y Alzheimer (EA).....	10
2.3.1 Cobre (Cu) en el cuerpo	12
2.3.2 Efectos del desbalance del cobre	15
2.3.3 Estrés oxidativo (EO).....	18
3. JUSTIFICACIÓN	21
4. HIPÓTESIS	22
5. OBJETIVO GENERAL	23
5.1 Objetivos particulares.....	23
6. SUJETOS Y METODOLOGÍA.....	24
6.1 Pruebas Conductuales.....	24
6.1.1 Anidación.....	24

6.1.2 Reconocimiento de objeto por ubicación (ROU) o por localización novedosa (ROLN).....	25
6.2 Toma de Muestra.....	27
6.3 Determinación de cobre.....	27
6.4 Actividad de superóxido dismutasa (SOD).....	27
6.5 Análisis estadístico.....	28
7. RESULTADOS.....	29
7.1 Anidación.....	29
7.2 Reconocimiento de objetos por ubicación (ROU).....	30
7.3 Determinación de Cu.....	33
7.3.1 Determinación de Cu libre en el hipocampo.....	34
7.3.2 Determinación de Cu unido en el hipocampo.....	35
7.4 Determinación de la actividad de SOD.....	36
8. DISCUSIÓN.....	38
9. CONCLUSIONES.....	44
10. REFERENCIAS.....	45
FIGURAS.....	53

1. INTRODUCCIÓN

La Enfermedad de Alzheimer (EA) es un padecimiento neurodegenerativo que tiene alta incidencia a nivel mundial (Alzheimer Association, 2015). Esta enfermedad se caracteriza por la pérdida gradual de la memoria, deterioro progresivo de funciones cognitivas como el razonamiento, el juicio, el pensamiento abstracto, etc.; también se presentan alteraciones en el comportamiento emocional y en la ubicación espacio-tiempo (Newton, 1948). En el cerebro se relaciona con la reducción del volumen del hipocampo, la amígdala y la corteza entorrinal, en donde la atrofia celular es producida por la presencia de marañas neurofibrilares y de placas beta amiloides (βA).

Para intentar discernir la etiología de la EA se han generado varias teorías, que explican el origen del déficit de la memoria; entre ellas se encuentra la hipótesis de los metales, en la cual la deposición de oligómeros de la proteína βA , que forma placas en el cerebro, deben su toxicidad a la interacción con biometales como el Zinc (Zn), el Hierro (Fe) y el Cobre (Cu). Con base en esta hipótesis se han creado quelantes como alternativa terapéutica para mitigar el déficit cognitivo al secuestrar los iones metálicos. Se cree que el efecto neurotóxico de los metales, definido como cofactor en otras enfermedades neurodegenerativas, es consecuencia de un desbalance de los mismos y la causa puede ser resultado de la edad, interacción con drogas, mutaciones genéticas, etc. (Zatta, et al., 2009). En la EA, el Cu está altamente relacionado con la neurotoxicidad causada por las placas y la generación de estrés oxidativo por medio de reacciones de Fenton. Hay estudios que evidencian que un desbalance de cobre forma parte de la etiología o se considera como un posible diagnóstico temprano para la EA (Bucossi, et al., 2011). Una aproximación experimental, recientemente propuesta, es el uso de un isótopo de cobre unido a un complejo (^{64}Cu -GTS-glyoxalbis(N(4)-methyl-3-thiosemicarbonato), cuya señal es rastreada en el organismo mediante la tomografía de positrones (PET), como una herramienta de diagnóstico para la EA y posiblemente otros trastornos neurodegenerativos (Baguña et al., 2017). Otro de los diagnósticos propuestos es la medición de la enzima superóxido dismutasa (SOD)

en sangre, cuya actividad se encuentra disminuida en pacientes con la EA (Snaedal, 1998; Boll et al., 2008). Esta enzima es vital para la reducción de aniones superóxido de tal manera que las concentraciones de dicho anión se mantengan en cantidades mínimas en el organismo para evitar daños por estrés oxidativo.

Para comprobar estas teorías se han usado diferentes modelos animales que permiten modificar u observar las condiciones del deterioro cognitivo; para esto se han desarrollado una serie de tareas conductuales que asemejan el comportamiento cotidiano humano. Entre estas tareas, están aquellas que se acercan a la actividad cotidiana como las pruebas de reconocimiento de objeto novedoso y/o por ubicación (Oliveira et al., 2010). Otras incluyen conductas innatas que son reguladas por el hipocampo, como la anidación, que es además una prueba conductual natural y que se altera cuando el hipocampo está dañado (Deacon et al., 2002). Asimismo, en el modelo murino triple transgénico para la EA (3xTg-AD) no se ha relacionado el déficit cognitivo y la cantidad de Cu libre y asociado a proteínas; por lo tanto, en el presente trabajo, se determinarán los niveles de Cu y de SOD en el hipocampo. Además, se compararán con el desempeño en una tarea natural de anidación y en dos periodos de desarrollo de la patología (asintomática 3 meses y sintomática de 12 y 18 meses) para proponer el periodo vulnerable en el cual el tratamiento con quelantes será eficaz con el fin de mitigar el déficit cognitivo, al volver solubles los oligómeros y evitar la formación de placas beta-amiloides, características de la fase sintomática de la EA.

2. ANTECEDENTES

2.1 Alzheimer

2.1.1 Historia

La Enfermedad de Alzheimer (EA) fue descrita por primera vez en 1906 por el Dr. Alois Alzheimer quien observó en su paciente, Auguste D., los síntomas de pérdida de la memoria, cambios de comportamiento al igual que dificultad en el uso del lenguaje (Alzheimer, 1906). Posteriormente, al examinar cortes del cerebro de la ya fallecida paciente, el Dr. Alzheimer observó que el cerebro presentaba placas y nudos neurofibrilares y notó la desaparición de neuronas en varias regiones del cerebro (Maurer, et al., 1997; Castellani et al., 2010). Adicionalmente a estas observaciones, en 1998 Graeber y colaboradores reportaron la mutación en la proteína APOE (Graeber et al., 1998), lo cual arrojó luz sobre el papel de los genes en la EA.

2.1.2 Epidemiología

Actualmente, la EA es el tipo de demencia más común a nivel mundial. En América latina, a principio del siglo XXI los casos de Alzheimer y otras demencias llegaban ser 200,000 mientras que se estima que para el año 2050 los casos aumenten hasta 1,3 millones (Alzheimer Association, 2015). En México, según la Secretaría de Salud, existen aproximadamente 350,000 pacientes con Alzheimer de los cuales 2,030 fallecen anualmente (Reséndiz, 2010). Los casos de Alzheimer prometen incrementarse conforme la población crezca y con ello, generar un gasto social y económicos altos. Las causas de la EA pueden ser: 1) aceleración del envejecimiento; 2) degeneración de las vías anatómicas, incluidos los sistemas colinérgicos; 3) factores ambientales como exposición a contaminantes, lesiones en la cabeza, y desnutrición; 4) factores genéticos incluyendo mutaciones de la proteína precursora de amiloide (APP) y la presenilina (PSEN) genes y variaciones alélicas en la apolipoproteína E (Apo E); 5) trastornos metabólicos resultantes de la disfunción mitocondrial; 6) factores vasculares que alteran la barrera

hematoencefálica; 7) disfunción del sistema inmune, y 8) agentes infecciosos (Armstrong, 2013).

2.1.3 Definición

A pesar de que la EA fue descrita hace más de 100 años, a la fecha no existe cura o un tratamiento efectivo que disminuya el deterioro cognoscitivo de los pacientes. La EA es de tipo neurodegenerativo crónico que se caracteriza por la pérdida gradual de la memoria y deterioro progresivo de las funciones cognitivas superiores como son el razonamiento, el juicio, el pensamiento abstracto, etc., así como alteraciones en el comportamiento emocional y ubicación espacio-tiempo (Newton, 1948; Murray et al., 2011).

A pesar de que la mayoría de los casos de la EA es de manifestación esporádica, sin historia familiar alguna, hay algunos factores hereditarios que parecen aumentar el riesgo de padecerla, pero la mayoría de los casos se presenta después de los 65 años (Armstrong, 2013). Así, estudios recientes relacionan la presencia del alelo E4 (E4ε) de la apolipoproteína (APO) en las personas seniles. Otra de las manifestaciones tempranas de la EA es la desorientación, síntoma que diferencia al AD de otras demencias, y en etapas más tardías de la enfermedad se hace presente la ya mencionada degradación de la capacidad cognitiva, como resultado de la muerte neuronal. Ésta, no solo es atribuida a las alteraciones producidas por la proteína Tau a nivel intracelular, sino que también a una acumulación extracelular de la proteína β-amiloide en forma oligomérica y su forma polimérica (Hardy & Higgins, 1992). Las posibles acciones sinérgicas de ambas proteínas es un tema de investigación que ha generado discrepancia sobre la contribución mayoritaria de cada una de estas proteínas auto agregativas (Lloret et al., 2015).

Se han hecho avances significativos en los campos de la genética, en la detección de moléculas (disminución de ADN mitocondrial, y aumento de βA₄₂ y tau fosforilada) por medio de biomarcadores en el líquido cefalorraquídeo y de neuroimagen, para descartar síntomas neuropsiquiátricos, cognitivos y de

comportamiento en el diagnóstico temprano de la EA (Apostolova, 2016). Los estudios por resonancia magnética de alta resolución (MRI por sus siglas en inglés) han permitido la creación de mapas en los que se visualiza la atrofia del hipocampo y la expansión de los ventrículos, conforme avanza el daño cognitivo en la EA (Thompson et al., 2004). Estos parámetros anatómicos, que se miden *in vivo*, reflejan la fisiopatología con base en las medidas estructurales de la volumetría hipocampal y de la corteza entorrinal, ambos aceptados para el diagnóstico en la investigación clínica, por la relación entre la atrofia del hipocampo (por la pérdida de sinapsis y neuronas) y el deterioro cognitivo (Mondragón et al., 2016).

Como se mencionó, histológicamente, esta enfermedad se distingue (por definición clínica) por la presencia de placas β A, como resultado de la mutación de la proteína precursora amiloidea (APP, por sus siglas en inglés). Estas placas se producen por una acumulación anormal de proteínas amiloidogénicas las cuales tienen la capacidad de agregarse en forma de estructuras fibrilares patológicas en el espacio intracelular. Otro rasgo importante son las marañas neurofibrilares (MNFs) las cuales están formadas por proteínas intracelulares compuestas de polímeros insolubles de la proteína Tau hiperfosforilada (Grundke-Iqbal et al., 1986, Lau & Brodny, 2008).

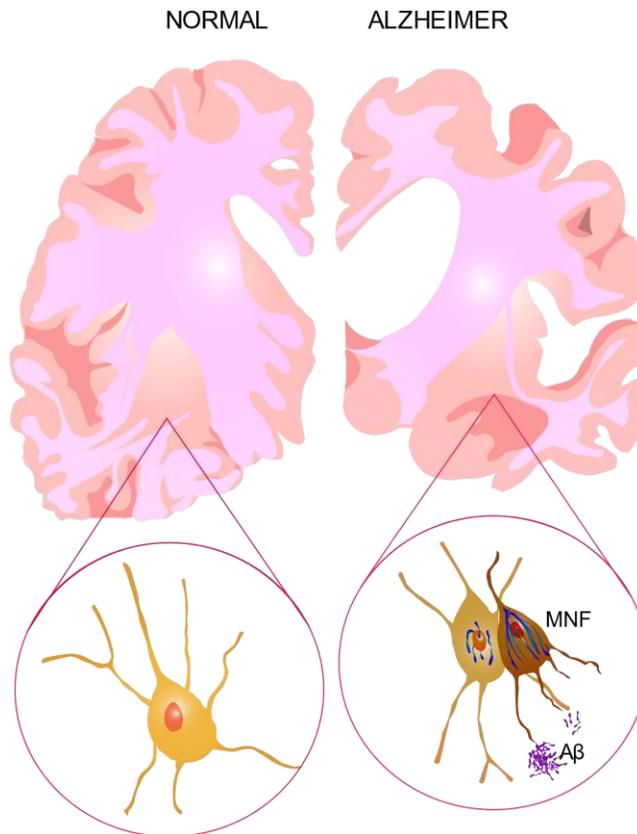


Figura 1. Diferencia de un cerebro sano y uno con padecimiento de Alzheimer. Neuronas normales y formando redes neurofibrilares (MNF) y placa de β -amiloide ($A\beta$). Imagen original.

2.2 Deterioro cognitivo y modelo murino

Tanto los estudios de MRI como los estudios *post mortem* en pacientes de EA muestran que el hipocampo es una de las primeras estructuras cerebrales en ser afectadas por la patología provocando un deterioro cognitivo. Uno de los primeros déficits cognitivos que presentan los pacientes de EA es la deficiencia de la memoria episódica (eventos específicos en un tiempo y lugar). Conforme la enfermedad avanza los síntomas se van agravando. En etapas tempranas de la EA, la memoria espacial ya se encuentra alterada, por lo que el deterioro de esta memoria podría ser un marcador temprano de la patología (Kessels et al., 2010). Además, debido a que la ubicación de objetos en un entorno es parte de la memoria (espacial), tiene un papel importante en ejecución de tareas diarias. Esta clase de memoria se puede descomponer en 3 mecanismos distintos: 1) procesamiento del objeto, 2)

procesamiento de la ubicación espacial y 3) relación entre el objeto y su ubicación. Los estudios muestran que tanto la formación hipocampal como las áreas parietales son críticas para la memoria de ubicación de objetos (Postma et al., 2008).

2.2.1 Modelos de ratón para la EA: Aspectos neuropatológicos y cognitivos

Existen varios modelos murinos transgénicos para el estudio de la EA que permiten entender los mecanismos celulares que la producen. La mayoría presentan limitaciones dado que se modelan usando genes que expresan mutaciones de la proteína ApoE4, que sólo están presentes en el 15-20% de los casos de la EA, de tipo familiar, mientras que el 80% es de tipo esporádico.

Los ratones triple transgénicos (3xTg-AD) contienen mutaciones de tres genes: presenilina (PS1), APP y la proteína tau, para provocar la expresión de las proteínas humanas de la EA. Dichos transgenes se localizan en el mismo locus, y su relevancia fisiológica permite explicar la forma familiar de la EA e incluso el tipo esporádico, aunque el modelo no ofrece una explicación acerca de la causa de la enfermedad ya que no hay patología humana causada por una triple mutación de los genes PSI, APP y tau. Sin embargo, permite conclusiones sobre el depósito de β A y cómo éste precede a la aparición de la proteína tau fosforilada. El 3xTg-AD muestra un depósito de β A dependiente de la edad y región cerebral específicos, así como déficits cognitivos relacionados con β A intraneuronal, lo cual lo vuelve interesante como modelo para el estudio de la EA. Este modelo fue creado por Oddo et al. en el 2003 en la Universidad de California por medio de una microinyección de los transgenes humanos PS1_{M146V}, APP_{Swe} y tau_{P301L} en el pronúcleo de la célula embrionaria del ratón “knock-in” para el gen de la PS1_{M146V} (Figura 2) y que al expresarse generan APP, placas A β y marañas de Tau (Oddo et al., 2003b). Como ya se ha mencionado anteriormente, presenta déficits de memoria que se relacionan con la acumulación de placas (Billings, et al., 2005). Consistente con la cascada amiloidea, las placas extracelulares de A β ₄₂ preceden a los ovillos neurofibrilares y se ambos desarrollan de manera secuencial y jerárquica en regiones cerebrales

como el subiculum, hipocampo y la corteza con un curso temporal similar al del cerebro humano.

A los 4 meses de edad el 3xTg-AD comienza a presentar los primeros déficits cognitivos; a los 6 meses comienzan a aparecer los oligómeros del péptido A β ; a los 12 meses se presentan los primeros depósitos de las placas A β y se inicia la formación de marañas, mientras que a los 18 meses de edad este ratón ya presenta, junto con el déficit cognitivo, las placas, las marañas e inflamación (Giménez-Llort, et al., 2007).

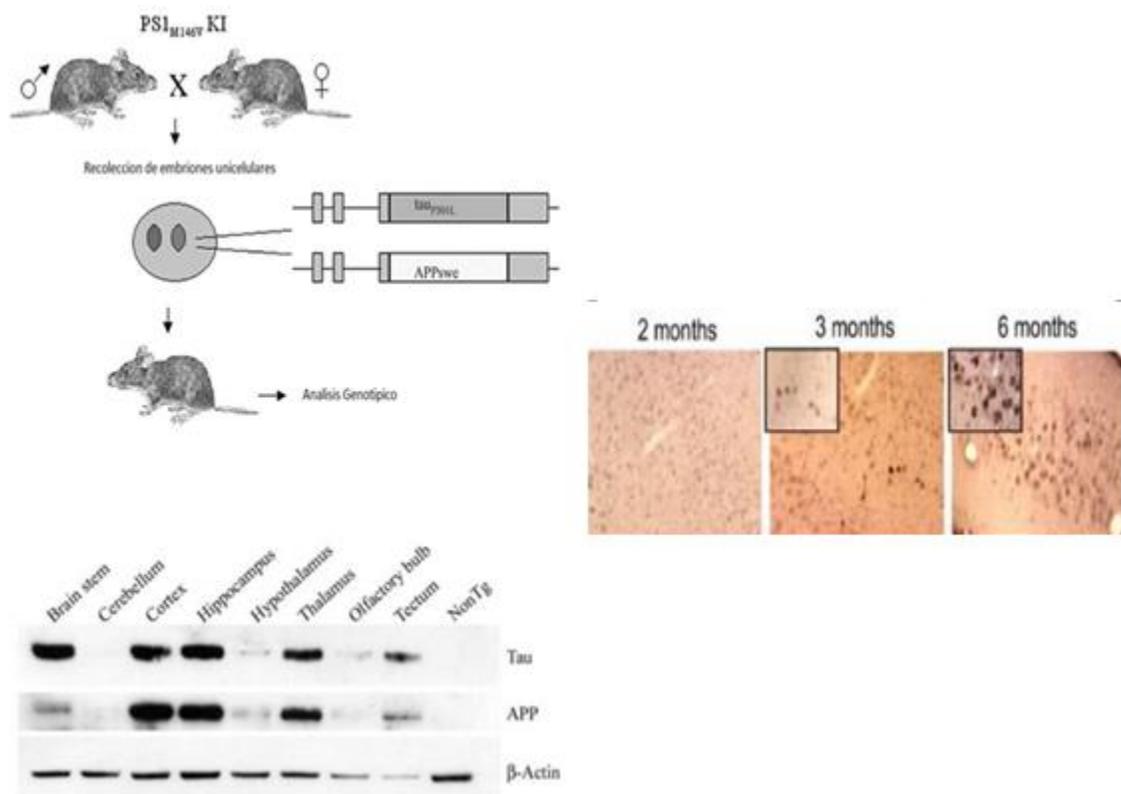


Figura 2. Modelo murino para Alzheimer, 3xTg-AD por Oddo et al. (a la izquierda) y (a la derecha) la aparición de placas en el hipocampo del 3xTg-AD a los 2, 3 y 6 meses de edad (tomado de Oddo et al., 2003; Janelsins et al., 2005).

2.2.2 Anidación

La anidación es una conducta innata en ratones que permite validar su comportamiento en el laboratorio como un indicador relevante de bienestar que a su vez puede ser usado con éxito para identificar factores estresantes (térmicos, jaulas con ratones agresivos, enfermedad y dolor) (Gaskill et al., 2013; Jirkof, 2014). Esta conducta está regulada por el hipocampo como lo demostraron los estudios de Deacon y colaboradores quienes realizaron varias pruebas cognitivas para observar el efecto de una lesión citotóxica en el hipocampo colocando individualmente a los ratones en jaulas, aproximadamente una hora antes de la fase oscura y los nidos se evaluaron a la mañana siguiente. El comportamiento de anidamiento se realiza en una habitación bien iluminada (~80 lux), y se le deja que se habitúe a la jaula novedosa durante 15 min, y luego se introduce un algodón comprimido (5.5 x 5.5 x 0.5 cm) en la caja. La altura y la anchura de los nidos se mide a los 30, 60 y 90 min (Deacon et al. 2002; Etherton et al., 2009). Los nidos así observados constan en un montículo debajo del serrín con un cráter en la parte superior, rodeado por algodón desmenuzado. Para el presente trabajo se tomó una puntuación de acuerdo con la siguiente escala: 1= montículo de serrín y cráter solo, sin algodón triturado; 2= montículo y cráter de serrín, con algodón desmenuzado y colocado alrededor y en el cráter para formar un nido en forma de copa; 3= el algodón triturado por el ratón, forma un nido redondo que cubre al ratón. El experimento se realizó en ratones de 3 meses de edad y los resultados de la anidación mostraron nidos realizados de manera pobre en el caso de los ratones con una lesión en el hipocampo. Esta prueba, junto con otras, permite el análisis de conductas sociales anormales, déficits sensitivo-motores y dolor asociado a depresión, entre otras (Negus et al., 2015).

2.2.3 Reconocimiento de objeto por ubicación

La prueba de reconocimiento de objetos (RO) fue introducida en 1988 por Ennaceur y Delacourt como herramienta para estudios de memoria episódica en ratas, por la inherente predilección de los roedores por la novedad (Ennaceur & Delacour, 1988). La versión más común consiste en la exploración de dos objetos idénticos durante

una sesión y, posteriormente, explorar un objeto idéntico a aquellos del entrenamiento junto con uno novedoso. La tarea también ha cambiado, usando objetos idénticos en la sesión de prueba, pero con uno de ellos en una nueva ubicación, con el fin de evaluar la memoria espacial en roedores a través de una versión modificada denominada colocación de objetos ubicación de objetos (ROU). Así, RO en roedores es generalmente considerando una tarea de memoria no espacial que implica el hipocampo, y las cortezas perirrinial, entorrinal y parahipocampales (Wilson et al.,2013) mientras que ROU considera una tarea de memoria espacial que se basa principalmente en el hipocampo (Broadbent et al., 2004).

En 2010, Oliveira y colaboradores realizaron un estudio con ratones a los que se les administró muscimol (agonista para los receptores a GABA_A) para inactivar el hipocampo y de esta manera probar que el hipocampo es indispensable para realizar la tarea de ROU y se concluyó que el hipocampo es requiere para el proceso de la información contextual y para una tarea de memoria espacial. En 2014, Vogel-Cierna y Wood describieron que la tarea de ROU, cuenta con ventajas tal como la reducción del estrés que generan pruebas como el laberinto acuático de Morris, así como la similitud a actividades más cotidianas de manera que el desempeño del ratón refleje de la mejor manera una conducta humana cotidiana. También indica que la prueba es dependiente de hipocampo y sensible a la región CA1 para la evocación de memorias del tipo espacial en la realización de la prueba (Oliveira, et al., 2010; Vogel-Cierna et al., 2014).

2.3 Metales y Alzheimer (EA)

Recientemente, la información sobre el papel de los biometales en la función cerebral y la enfermedad se ha incrementado, así como el desarrollo de enfoques terapéuticos que puedan ser capaces de restaurar el balance químico del cerebro. Existe vínculo entre la homeostasis de los metales y los trastornos cerebrales, por su interacción en la función sináptica, y la neurodegeneración en enfermedades como el Alzheimer (White et al., 2015). Los resultados de estas investigaciones

podrían arrojar luz sobre nuevos detalles mecanísticos acerca del papel de los metales en el desarrollo de la EA (Hare et al., 2016).

Los metales son ubicuos en los organismos, tienen un papel preponderante en sus funciones; y producen alteraciones en ellas. El sistema nervioso central (SNC) es vulnerable a las alteraciones de la homeostasis de los metales, dadas sus altas concentraciones de metales con respecto al resto de los órganos; tiene un alto riesgo al estrés oxidativo y al desbalance en la defensa antioxidante, por tanto, un desbalance de ellos es relevante en las enfermedades neurodegenerativas como la EA (Que et al., 2008; Duce & Bush, 2010).

Se estima que el 30% de las enzimas utilizan metales para sus funciones (Guengerich, 2009). En su estado basal, el transporte en el SNC está controlado por ligandos y transportadores. Los tres principales metales de transición son el cobre (Cu), el zinc (Zn) y el hierro (Fe), involucrados en la función sináptica o modulando la expresión de ciertos patrones sinápticos. El Cu se transporta por proteínas (ceruloplasmina y albúmina) y cruza la barrera hematoencefálica (BHE) por medio del transportador ATP7A y Ctr1 (Duce & Bush, 2010; Eskici & Axelsen, 2012). El Zn se transporta por medio de la metalotioneína ZnT1-10 (Que et al., 2008; Sensi et al., 2009) y el Fe es transportado y cruza la BHE con ayuda de la transferina (Duce & Bush, 2010; Que et al., 2008).

La deficiencia de Cu y el aumento de Zn y el Fe acelera la progresión de la EA, al tiempo que se encuentra una alta concentración de estos metales en las placas β -amiloides (Lovell et al., 1998; Miller et al., 2005). Al alterarse APP, se altera la apolipoproteína (Apo), se altera la interacción entre β -amiloide, Cu y Zn en la cercanía de las sinapsis glutamatérgicas, dando como resultado oligómeros tóxicos de A β con la consecuente pérdida neuronal (Bush & Tanzi, 2008). La proteína APP contiene Cu y Zn ligado al sitio amino terminal. El péptido A β es capaz de formar un enlace con Cu, Zn y Fe en una relación 1:1 y una relación 1:2 para el Fe cuando forma un complejo con A β ₄₂ (Garzon-Rodriguez, et al., 1999). El Cu está implicado en la regulación de la expresión de ambas, APP y β -secretasa, BACE1 (Armendariz et al., 2004; Angeletti et al., 2005), el Zn está implicado en la modulación y expresión

de las presenilinas y subunidades de las gamma y alfa secretasas. Así, la alteración del metabolismo en los metales (Cu y Fe), afecta aspectos de la expresión de la APP. La sobreexpresión de APP o del fragmento carboxilo terminal en animales transgénicos resulta en un fenotipo deficiente de A β , mientras que la ablación de la APP en células en cultivo produce la acumulación de Cu (White et al., 1999; Bellingham et al., 2004).

Por lo tanto, parece haber una relación intrínseca entre la expresión de APP y A β y la co-localización de los metales en el cerebro del Alzheimer, que promueven la generación del estrés oxidativo. Aunque también podrían ser acciones coincidentes y no causales.

2.3.1 Cobre (Cu) en el cuerpo

Dentro del cuerpo humano, el Cu tiene diversas funciones: producción de colágeno, formación de glóbulos rojos, regulación de niveles de colesterol, absorción de hierro, oxidación de ácido grasos, producción de melanina y control de los niveles de energía dentro de la célula. A su vez, participa en el desarrollo, regulación y el correcto funcionamiento de los sistemas cardiovascular y neuroendocrino al igual que en la homeostasis del hierro. El cuerpo humano contiene entre 80 a 100 mg de Cu y este contenido varía de acuerdo con la edad y sexo (la ingesta normal en un adulto es de 4.2 a 12.2 mg/semana). El Cu se obtiene naturalmente a través de los alimentos mientras que el agua contribuye poco a su consumo diario (<0.001mg/día). En los alimentos, el Cu se encuentra unido a compuestos orgánicos. Una vez ingerido, éste es absorbido por el intestino y de ahí es transportado al hígado donde es procesado de manera segura, y posteriormente, es secretado en la sangre para ser llevado hacia otros órganos; la cantidad de Cu que no es usada se secreta a través de la bilis y es eliminada a través de las heces. Las concentraciones más altas de Cu se encuentran en el cerebro, hígado y el corazón.

Una vez dentro del cuerpo humano, el Cu es regulado por las proteínas, cuya función es asegurar la correcta distribución de dicho metal a blancos celulares

específicos, en cualquiera de sus estados de oxidación principales: Cu (I) que se encuentra en el medio intracelular (medio reductor), mientras que el Cu (II) se encuentra principalmente en el medio extracelular (medio oxidante). Ambos estados del Cu presentan propiedades químicas distintas: Por ejemplo, Cu (I) no es estable en una solución acuosa, donde se oxida con facilidad a Cu (II) que a su vez tiene muy poca tendencia a reducirse a Cu (I) ya que su potencial de reducción estándar es de 0.153 V (Tegoni et al., 2014). Las proteínas chaperonas, a las que este metal se asocia ya sea en su estado de oxidación Cu (II) o Cu (I), no sólo lo mantienen estable, controlando su absorción y distribución dentro de las células, sino que también previenen su intervención en reacciones redox indeseadas (Johnson & Giulivi, 2005) que como resultado generan especies reactivas, como el peróxido de hidrógeno e hidróxido (Donnelly et al., 2007).

En la figura 3, se indica el ingreso de Cu a la célula por medio de la proteína transmembranal Ctr-1. Una vez dentro de la célula el Cu puede ser transportado al aparato de Golgi por medio de adenilofosfatasa (ATPasas): ATP7A y ATP7B que lo reciben de la chaperona Atox1. ATP7A y ATP7B son proteínas transmembranales que, además de bombear Cu (I) al aparato de Golgi, son reguladores finos de su adsorción. Si el Cu está en altas concentraciones, éste puede ser trasladado desde el aparato de Golgi a la membrana celular y llegar al espacio extracelular. La proteína ATP7A regula el transporte de Cu del intestino a la sangre, mientras que la ATP7B participa su excreción a través de la bilis. El Cu también es transportado al complejo Citocromo-C Oxidasa (CcO) por medio de seis chaperonas, las cuales son necesarias para transportarlo a sus sitios correspondientes dentro del complejo: Cox17, Cox19, Cox23 (estas tres son proteínas solubles), Sco1, Sco2 y Cox11 (proteínas de membrana interna mitocondrial). La Ccs conduce al Cu hacia una de las isoformas de la SOD, CuZn-SOD, que necesita Cu para su actividad catalítica y que se distribuye en el citoplasma, núcleo y en el espacio intermembranal de la mitocondria. Su finalidad es catalizar la dismutación del ion superóxido (O_2^-) producido durante la cadena respiratoria, inmersas en el citoplasma, también se encuentran las metalotioneinas (MT) cuya función es proteger a la célula de la

toxicidad, que causa el Cu, llevando dicho metal a blancos específicos dentro de las células (Eskici & Axelsen, 2012; Manto, 2014).

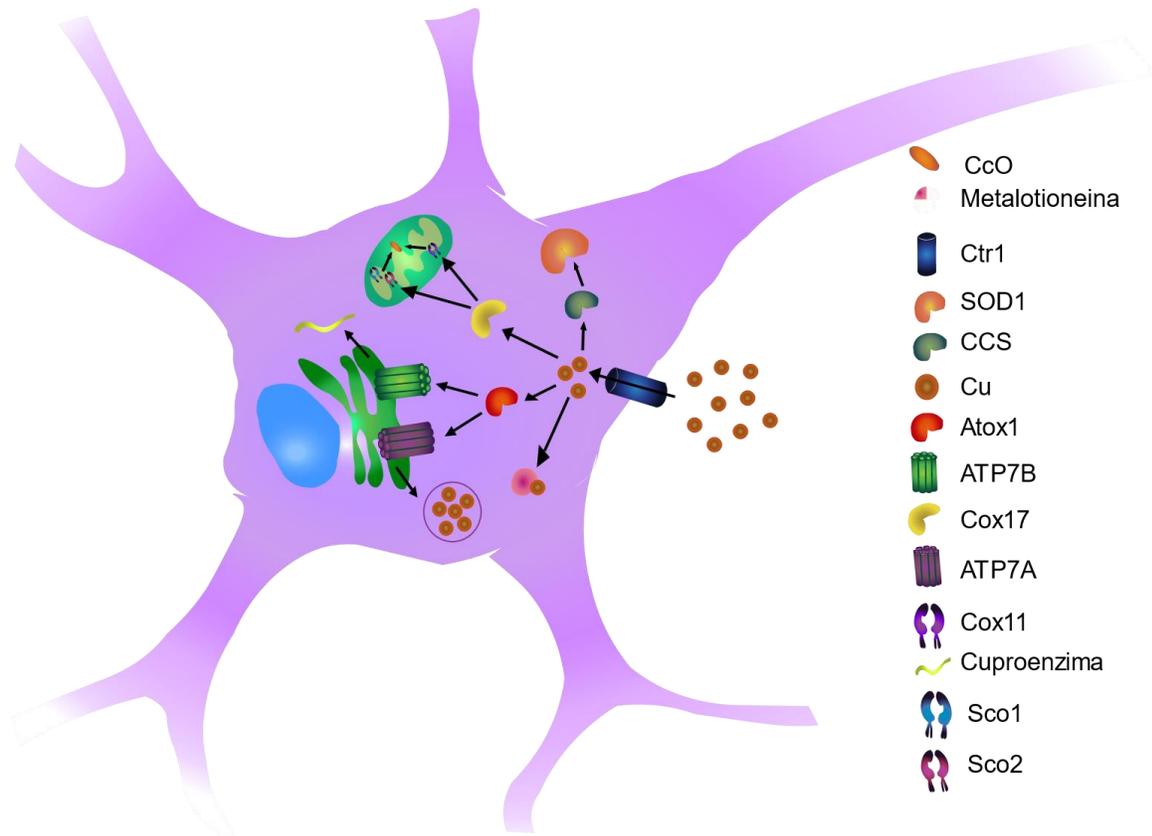


Figura 3. Ingreso y transporte de Cobre en la neurona. Atox1, Chaperona de cobre antioxidante 1; ATP7A, ATPasa Transportadora de cobre de tipo P (Proteína de Menkes); ATP7B, ATPasa Transportadora de cobre de tipo P (Proteína de la Enfermedad de Wilson); CcO, Citocromo C oxidasa; CCS, Chaperona de Cobre para Superóxido dismutasa; Cox11, Chaperona de cobre para citocromo C oxidasa; Cox17, Chaperona de cobre para citocromo C oxidasa; Ctr1, Proteína transportadora de cobre tipo1; Sco1, Proteína de ensamblaje de la citocromo C oxidasa; Sco2, Proteína de ensamblaje de la citocromo C oxidasa; SOD, Superóxido dismutasa 1.

En sangre, el 90% del Cu está contenido en la ceruloplasmina (Cp) y el resto (5-15%), que no está acoplado a ella, se denomina “cobre libre” a pesar de que pueda estar acoplado a pequeñas proteínas o albúmina (Tegoni et al., 2014). En el cerebro, el Cu participa como cofactor enzimático de reacciones redox (enzima SOD Cu/Zn), en la cadena transportadora de electrones de las mitocondrias (citocromo C oxidasa); en la síntesis de neurotransmisores (dopamina-β-monooxigenasa), en

la síntesis de neuropéptidos (enzima monooxigenasa peptidil-glicina- α -amidante) y ayudando al metabolismo del Fe (Balamurugan & Schaffner, 2006; Scheiber. et al., 2014). Este metal se encuentra principalmente en los ganglios basales, hipocampo (Harrison et al., 1968), cerebelo, varias membranas sinápticas y en los cuerpos celulares de neuronas granulares y piramidales (Desai & Kaler, 2008).

2.3.2 Efectos del desbalance del cobre

La concentración anormal y descontrolada de Cu dentro de la célula puede ser responsable del daño celular oxidativo como resultado de la producción de Especies Reactivas de Oxígeno (ERO); por esta razón es importante la distribución, uso y excreción de éste. En exceso, el Cu puede producir alteraciones morfológicas y metabólicas en el tejido humano y, si no es tratado, puede llevar a la muerte. La acumulación de Cu puede ser resultado alteraciones genéticas y medioambientales que afectan su transporte normal (Uriu-Adams et al., 2005; Gupta & Lutsenko, 2009).

Una mutación en el gen que expresa ATP7B, provoca problemas en la excreción de Cu y, en consecuencia, la enfermedad de Wilson que se caracteriza por daños hepáticos, tal como la hepatitis y la cirrosis, al igual que trastornos neurológicos. La enfermedad de Menkes (EM), se presenta como resultado de la mutación en el gen de la proteína ATP7A por tanto, hay pérdida de la correcta distribución de Cu que al acumularse en el intestino lo cual ocasiona un déficit de este metal y una actividad reducida en las enzimas dependientes de Cu. También, la EM, se caracteriza por la acumulación de Cu en las células de la barrera hematoencefálica (barrera que protege al cerebro) y una alteración su transporte de la sangre hacia las neuronas, trastorno neurodegenerativo, hipotermia, alteraciones en el tejido conectivo, anomalías en la marcha y una disminución en la tensión del músculo (hipotonía).

En estudios sobre la EA, se ha encontrado que el Cu sufre un desbalance en la concentración (total) de su forma libre y asociada a proteínas, pero también en otros estudios se reporta que la concentración de los metales no cambia, aunque

hay una inestabilidad en la regulación de dichos metales. El Cu, al igual que el Zn, se une al polipéptido A β al encontrarse disponible cuando las vesículas de Zn y Cu son liberadas al medio extracelular (Brewer, 2008; Squitti et al., 2008; Zatta, et al., 2009).

2.3.2.1 Metales en el Sistema Nervioso Central del 3xTg-AD

En el SNC de roedores y en el modelo murino para el Alzheimer (3xTg-AD) se han hecho mediciones de Cu sin establecer una diferenciación entre libre y asociado a proteínas, que permitiría probar que el desbalance de este metal acelera la enfermedad. En 2004 Tarohda y sus colaboradores estudiaron en la rata Wistar sanas de diferentes edades (1, 3, 5, 7, 14, 21, 42, 77 y 147 días de edad) y en cortes sagitales de 20 μ m de espesor, en 18 zonas del cerebro, incluyendo el hipocampo, las concentraciones además de Cu, Fe, Zn y Magnesio (Mg) usando ICP-MS (Espectroscopía de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente). En el estudio (Figura 4) se observa cómo aumentan y se distribuyen estos metales a lo largo del desarrollo del SNC de la rata y cómo su concentración alcanza una constante cuando el cerebro ya ha madurado (Tarohda et al., 2004).

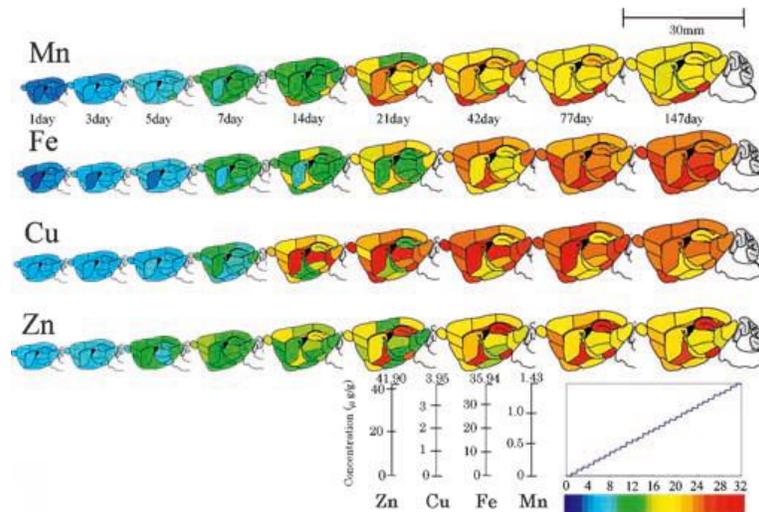


Figura 4. Distribución de la concentración de Zn, Cu, Fe y Mn en el cerebro de la rata durante el desarrollo. Tomado de Tahroda et al. (2004).

En 2007, Squitti y colaboradores midieron la cantidad de cobre asociado a ceruloplasmina (Cp) y la concentración de Cu no ligado a Cp (NCp) en el plasma sanguíneo de pacientes con diagnóstico de probable Alzheimer. En este estudio se concluye que no hay cambios significativos tanto en la cantidad de Cp y el Cu asociado a ésta, pero ocurren cambios en la cantidad de Cu total y el NCp, en sangre (Cu libre). En un segundo estudio del grupo de Squitti y colaboradores en 2010, muestran que hay una relación entre la capacidad cognitiva y la concentración de Cu libre encontrado en la sangre de los pacientes. La capacidad cognitiva de los pacientes se evaluó mediante pruebas neuropsicológicas y el Cu libre, en sangre, se determinó por medio de espectrofotometría de absorción atómica (EAA). Observaron que hay una relación entre un decremento en el desempeño de las pruebas y la cantidad de Cu libre en la sangre. Por tanto, concluyen que el aumento de Cu libre puede ser un factor de riesgo para la disminución de la capacidad cognitiva (Squitti et al., 2007; Salustri, et al., 2010).

En 2008, Drago y colaboradores realizaron un estudio de ICP-MS, en ratones 3xTg-AD de 14 meses y ratones de 14 meses PS1_{K1} (usados como control), y compararon las concentraciones de aluminio (Al), Fe, Cu y Zn (sin diferenciación entre iones libres y asociados a moléculas). Las concentraciones de dichos metales no son diferentes en ambos modelos, sólo en la corteza hubo aumento en la concentración de Al mientras que en la concentración del resto de los metales no se observó alguna variación significativa. En 2011, Quinn y colaboradores midieron el contenido en Cu en plasma y la corteza frontal de ratones, hembras y machos, 3xTg-AD de 14 meses por medio de EAA y el contenido de Cu (total), en la sangre y en el líquido cefalorraquídeo, por medio ICP-MS, en pacientes de ambos sexos con EA. El estudio se realizó para relacionar los niveles de Cu con el género. Los valores obtenidos, en ambas pruebas fueron comparados con un control. Cabe destacar, de este estudio, que se obtuvieron los valores de las concentraciones de Cu en la corteza de ratones viejos saludables y ratones viejos con EA. Al comparar estos estudios con aquellos realizados en mujeres, se concluyó que en ambas, (mujeres y ratones hembras) tienen un contenido en Cu más alto que el sexo

masculino en ambas especies y esta tendencia se mantenía con la EA (Drago et al., 2008; Quinn et al., 2011).

2.3.3 Estrés oxidativo (EO)

Las alteraciones moleculares en las células provocan fallas neuronales a través de una amplia variedad de mecanismos, como lo es el estrés oxidativo (EO) resultante de la formación de placas β A y, junto con las mitocondrias envejecidas, contribuyen al origen crítico de la neurodegeneración en la EA. El mecanismo por el cual las mitocondrias procesan carbohidratos y establecen un gradiente de protones para la síntesis de ATP (ciclo del ácido tricarboxílico y la fosforilación oxidativa) implican la transferencia controlada de electrones de agentes reductores a agentes oxidantes fuertes. Algunos de los radicales libres generados escapan y, en lugar de transportar adecuadamente su electrón a la siguiente molécula en la cascada, abandonan la membrana interna de las mitocondrias e imponen alteraciones en otras macromoléculas dentro de la célula. Estas alteraciones a menudo son perjudiciales: la oxidación del ADN y/o ARN puede producir fragmentación y deficiencias en la maquinaria de reparación (Bradley-Whitman, et al., 2014).

La modificación oxidativa de las enzimas y de las proteínas de señalización metabólica pueden provocar alteraciones en otras proteínas y modificaciones en la red de proteólisis, que a su vez ocasionan que las proteínas sean insolubles y propensas a agregarse anormalmente (Sayre et al., 2001). El daño inducido por los radicales libres a macromoléculas ha sido observado en la EA, y la deposición de iones redox activos que son capaces de generar los radicales más dañinos, como el hidroxilo (OH^\cdot) a través de la reacción de Fenton, que exacerba tanto el espectro de moléculas como las áreas celulares afectadas.

Asimismo, el EO que caracteriza el envejecimiento es un factor de riesgo para la EA porque promueve la fragmentación del ADN y produce cambios apoptóticos. Por autopsias de la corteza cerebral de pacientes con mutaciones del gen APP se demostró la presencia de mayor EO (Bogdanovic, et al., 2001).

Por otra parte, para mantener el balance en la producción de las especies oxidantes, los antioxidantes interactúan con los intermedios del radical libre e inhiben otras reacciones redox oxidándose ellos mismos. Debido a esto, es que los antioxidantes son a menudo agentes reductores y son necesarios en los principales sitios de producción de EO. Diversos agentes bajo investigación como el β -caroteno, la acetil-N-cisteína y el ácido-lipoico, muestran potencial para evitar el EO. Con base en estudios prospectivos y en la complejidad del sistema redox *in vivo*, una combinación equilibrada de varios antioxidantes también puede ejercer un efecto significativo en la prevención de la EA. La respuesta antioxidante de las neuronas es capaz de estancar los efectos del EO durante años y los déficits metabólicos resultantes de las disfunciones mitocondriales que no aparecen sino hasta la vida adulta, cuando se manifiestan los primeros aspectos de la demencia (Moneim, 2015).

Por lo tanto, el EO es un proceso que va en aumento conforme a la edad, debido un exceso de especies oxidantes como resultado de un desbalance entre antioxidantes y oxidantes. Este desbalance se puede producir por un incremento de radicales libres o bien, un decremento en la defensa antioxidante. El cerebro, es un órgano sensible al EO dada su alta actividad metabólica, su abundancia en biometales y de lípidos (Huang et al., 2016; García-Mesa et al., 2012). Por otra parte en los estudios experimentales realizados en humanos y en los modelos animales, se reporta que el EO se encuentra relacionado con la EA y con el desbalance de los metales.

2.3.3.1 Superóxido dismutasa (SOD)

La reducción del anión superóxido (O_2^-) realizada por la enzima superóxido dismutasa (SOD), es una función antioxidante importante en las células. Existen 3 tipos de SOD con diferentes ubicaciones: SOD1 en el citoplasma, SOD2 en la matriz mitocondrial y SOD3 en el espacio extracelular. SOD1 es un dímero (de 2 subunidades), mientras que las otras dos son tetrámeros (cuatro subunidades). La SOD1 y la SOD3 contienen Cu y Zn, Mientras que SOD2 usa manganeso (Mn) como

cofactor. El anión O_2^- , resultado de la reducción de un oxígeno por un electrón es un precursor de varias especies reactivas de oxígeno (ERO). Éste es un intermediario bastante inestable pero cuando se reduce de manera parcial, como resultado de una reacción catalizada por metales de transición reducidos, da lugar a un radical hidroxilo (OH^\cdot), el cual es altamente oxidante. Para prevenir las ERO y regular la concentración de O_2^- , el primer mecanismo de defensa es la enzima SOD que dismuta (reduce) O_2^- y produce peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Huang et al., 2016). Posteriormente H_2O_2 es reducido a agua por medio de la enzima catalasa (Cat) o Glutación peroxidasa (Gpx). En estudios con murinos se ha observado que el superóxido puede tener un rol causal en algunas manifestaciones de EA (Clausen et al., 2012).

En un estudio de Haan, et al., (1992) se reporta que en los ratones se aumenta tanto la expresión como la actividad de SOD1 junto con el aumento de la edad. En el caso del ratón 3xTg-AD Resende (2008) observó un aumento en la actividad de SOD en los cerebros de ratones hembras 3xTg-AD de 3 a 5 meses de edad comparados con los controles. En otro estudio, de García-Mesa (2016) observó que en ratones machos 3xTg-AD de 12 meses de edad, en los cuales la enfermedad ya se ha manifestado, la actividad de SOD se reduce de manera significativa con respecto a los ratones no transgénicos para la EA.

3. JUSTIFICACIÓN

Actualmente hay estudios que relacionan la presencia de un desbalance en la cantidad de cobre (Cu), libre y asociado a proteínas, con la enfermedad de Alzheimer (EA); este desbalance incrementa la formación, deposición de las placas beta-amiloides (β A) y genera estrés oxidativo (EO).

Por tanto, se requiere profundizar sobre la relación del desbalance de Cu y las conductas dependientes del hipocampo, al comparar su desempeño en dos tareas cognitivas y en diferentes etapas: asintomática y sintomáticas. Además, es de importancia determinar la cantidad de Cu en el hipocampo (estructura relacionada con la memoria) en el modelo de ratón para la EA (3xTg-AD), libre o asociado a proteínas, ya que hasta el momento sólo se ha medido la cantidad de Cu total en el cerebro. También se pretende relacionar la presencia de Cu libre con la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) como primer mecanismo de defensa en contra de las especies reactivas de oxígeno (ERO) por su regulación en la concentración del ion superóxido (O_2^-). Tomando en cuenta lo anterior y, considerando que en este modelo no se han relacionado el déficit cognitivo y la cantidad de Cu libre y asociado a proteínas, se propone determinar los niveles de Cu y actividad de la SOD en el hipocampo de los ratones, los cuales fueron sometidos a una tarea natural de anidación en diferentes periodos de desarrollo de la patología, donde se forman las placas β A en el subiculum e hipocampo, en las edades asintomática (3 meses) y sintomáticas (12 y 18 meses), y como perspectiva, para proponer un periodo crítico en el cual pudieran actuar agentes quelantes para retardar la formación de los oligómeros β A y su deposición en forma de placas en la formación hipocampal (subiculum e hipocampo), y por lo tanto, retardar el déficit cognitivo.

4. HIPÓTESIS

Los ratones no transgénicos y los 3xTg-AD en edad asintomática de la EA (3 meses), construirán nidos eficientes, se desempeñarán adecuadamente en la tarea de reconocimiento de objeto por ubicación, y estos eventos se relacionarán con una menor proporción de cobre libre y mayor actividad de la enzima superóxido dismutasa en el hipocampo.

Los ratones 3xTg-AD en edades sintomáticas con la patología desarrollada (12 meses) y seniles (18 meses), construirán nidos menos eficientes, se desempeñarán pobremente en la tarea de reconocimiento de objeto por ubicación, y estos eventos se relacionarán con una mayor proporción de cobre libre y menor actividad de superóxido dismutasa en el hipocampo.

5. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el déficit cognitivo dependiente de hipocampo, en relación con la cantidad de cobre libre y la actividad de la enzima superóxido dismutasa en ratones macho transgénicos (3xTg-AD) en diferentes edades: 3, 12 y 18 meses y compararlo con el de ratones no transgénicos (nTg) de la misma edad.

5.1 Objetivos particulares

Tanto en los grupos experimentales (3xTg-AD) como en los controles (nTg):

- a) Evaluar el desempeño en las tareas de anidación y reconocimiento de objeto por ubicación.
- b) Medir las concentraciones de Cu, libre y asociado a proteínas en el hipocampo.
- c) Determinar la actividad de SOD en el hipocampo.

6. SUJETOS Y METODOLOGÍA

Para la realización del protocolo se usaron grupos de ratones machos, 3xTg-AD comparados con los nTg, de 3 meses, 12 meses y 18 meses de edad, con un número de 10 ratones en cada edad y grupo (3xTg-AD y nTg). Todos los ratones 3xTg-AD y nTg fueron criados en condiciones óptimas de bioterio, mantenidos a una temperatura de 20 ± 2 °C con ciclos de luz/oscuridad de 12 horas (7:00 am a 7:00 pm), con alimento en pellet y agua *ad libitum*, siguiendo las normas internacionales para el cuidado y uso de animales de laboratorio establecidas por el Consejo de Investigación Nacional de las Academias Nacionales de los Estados Unidos de América (NRC, 2001) y del Comité de Bioética del Instituto de Neurobiología de la UNAM.

6.1 Pruebas Conductuales

6.1.1 Anidación

La construcción de un nido es una conducta natural que realizan los roedores pequeños, como ratones, tanto hembras como machos, con fines de reproducción, mantenimiento de la temperatura y protección contra los depredadores. La anidación es una prueba conductual que consiste en la evaluación de la capacidad de un ratón de construir un nido. Esta capacidad es sensible a mutaciones genéticas y lesiones cerebrales. Una lesión en el hipocampo puede disminuir la capacidad de la construcción del nido.

La prueba de anidación realizada se basó en el protocolo creado por Deacon (2006). Donde dejando al ratón, en una caja individual, con 3g de algodón comprimido al iniciar el ciclo de oscuridad. Al terminar el ciclo de oscuridad se revisa el nido hecho por cada ratón y se califica en una escala del 1 al 5 (Figura 5).

1. El ratón no toca el algodón.
2. Sólo parte del algodón es roído y esparcido.
3. Del 50% al 90% del algodón ha sido roído y esparcido.

4. Se forma un nido plano, pero las paredes no son más altas que el cuerpo del ratón.
5. Se tiene un nido que cubre al ratón con más del 90% del algodón roído y esparcido.



Figura 5. Escala de Calificación del nido. Tomado de Orta-Salazar et al. 2013

Como en trabajos previos en el laboratorio (Orta-Salazar et al., 2013), de la escala creada por Deacon se fijaron sólo 3 de las 5 calificaciones:

- 1) El algodón está básicamente intacto.
- 2) La mayoría del algodón está roído, pero no hay un nido definido.
- 3) Construcción de un nido casi perfecto (= a la calificación de 5 por Deacon).

6.1.2 Reconocimiento de objeto por ubicación (ROU) o por localización novedosa (ROLN)

La prueba ROU está basada en la tarea de reconocimiento de objeto nuevo donde el hipocampo desempeña un papel importante en la detección espacial del cambio de lugar de un objeto conocido a una nueva ubicación (Oliveira et al., 2010).

Esta prueba se realiza en cuatro sesiones (Figura. 5):

- 1) Se comienza con una sesión de habituación en la que se deja al ratón explorar la caja (19 x 18 x 22 cm) con una clave espacial en uno de los lados, sin objetos, durante 5 min.
- 2) Al día siguiente se lleva a cabo la sesión de exploración en la que se le permite al ratón explorar los objetos, los cuales consisten en una tapa de 2.5

cm de diámetro y en un vial de 1.5 ml (objeto A y objeto B, respectivamente) por 10 min.

3) Después de 90 min se realiza una sesión en la cual se evalúa la memoria de corto plazo del ratón al mover unos de los objetos, (A, a otra ubicación espacial). Se deja al sujeto explorar el entorno y los objetos durante 3 min.

4) Pasadas 24h se ejecuta una prueba de memoria a largo plazo en la cual el objeto que no fue reubicado en la sesión anterior, B, se coloca en una nueva ubicación y se vuelve a dejar al sujeto explorar su entorno y los objetos por 3 min.

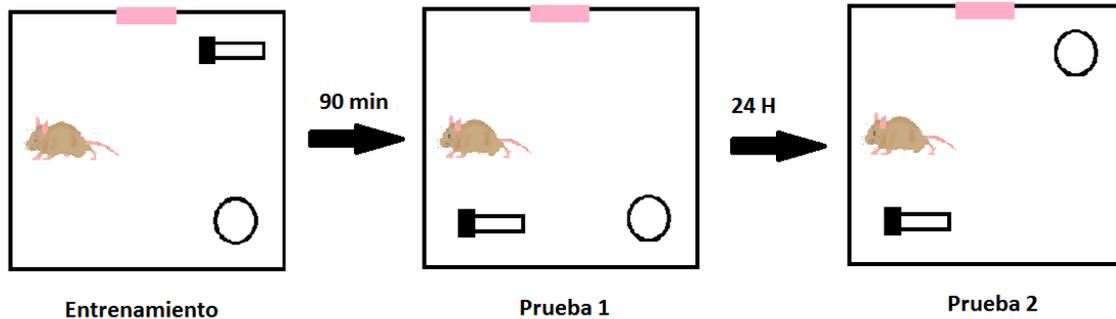


Figura 6. Representación esquemática de la conducta de ROU

Para calcular el tiempo de exploración (T) se sumó el tiempo que se exploró el objeto A (t_A) y el objeto (t_B):

$$T = t_A + t_B$$

Para calcular el índice de discriminación (ID) en la prueba de memoria de corto plazo:

$$ID = \frac{(t_B - t_A)}{(t_A + t_B)}$$

Para calcular el índice de discriminación (ID) en la prueba de memoria de largo plazo:

$$ID = \frac{(t_A - t_B)}{(t_A + t_B)}$$

6.2 Toma de Muestra

Para la extracción de los cerebros, los ratones fueron sacrificados por decapitación, según la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Se extrajo de cada hemisferio el hipocampo, se separaron indistintamente para las pruebas de actividad de SOD y para el análisis cuantitativo de Cu, y se conservaron a -80°C hasta su análisis.

6.3 Determinación de cobre

Para obtener la concentración de Cu se homogenizó medio hipocampo (la lateralidad se eligió de forma aleatoria), medio cerebelo y el resto del hemisferio cerebral en una relación 1g/10ml de amortiguador para cada tejido usando un amortiguador de fosfato monobásico de potasio 5M pH 7.4. Después se procedió a centrifugar el homogenado durante 30 min a 7,500 g. Se tomó el sobrenadante y se vació en tubos Amicon® Ultra-0.5 de 500 μL (corte de peso a los 3 kDa) para separar el Cu libre del Cu asociado a proteínas, por medio del filtro de celulosa que contiene el tubo. Se centrifugó el sobrenadante a 12,000 g por 15 min. Se recuperó el filtrado y se procedió a medir el Cu libre en un espectrofotómetro de absorción atómica (Perkin-Elmer 3110) con una metodología basada en el trabajo de Rubio-Osornio (2013).

Previamente a la medición de cobre de los tejidos se realizó una curva de calibración para calcular la concentración de cobre por regresión lineal.

Después de recuperar el filtrado se recuperó el concentrado y se determinó la concentración de Cu. La determinación de cobre por medio de espectrofotometría de absorción atómica no permite la diferenciación entre Cu^+ y Cu^{2+} .

6.4 Actividad de superóxido dismutasa (SOD)

La medición de la actividad de la enzima SOD se realizó siguiendo la metodología de McCord & Fridovich (1969). Se homogeniza el tejido en un amortiguador de fosfato de potasio (KH_2PO_4) de pH 7.8 con EDTA ($1.2 \times 10^{-4}\text{M}$). Se hace una mezcla

de reacción en la que se adiciona Xantina 1.5mM, Xantina oxidasa 6×10^{-9} M y Ferrocitocromo C 0.6 mM, junto con 1.5 mg de proteína de la muestra. El Ferrocitocromo C se reduce al entrar en contacto con el ión superóxido. Se mide su absorbancia a 550nm. Se define una unidad de actividad a la cantidad de SOD necesaria para inhibir a la mitad la reducción de Ferrocitocromo C.

6.5 Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron mediante el software GraphPad Prism 5. Se usó la prueba de Shapiro para evaluar la homogeneidad de varianzas en cada grupo. El análisis estadístico se realizó con la prueba paramétrica ANOVA de dos vías, con un factor (edad) de medidas repetidas, en algunas pruebas se usó el logaritmo de los datos, cuando éstos no presentaron homogeneidad de la varianza (Box, 1953; Gustafsson et al., 2004) y por lo tanto, para asegurar que las varianzas eran homogéneas antes de realizar el ANOVA, se repitió la prueba de Shapiro. Como prueba *post hoc* se usó Bonferroni. En otros casos, al no encontrar varianzas homogéneas, se usó la prueba de Kruskal- Wallis para comparar ratones 3xTg-AD o nTg entre sí, en las diferentes edades, al mismo tiempo, la prueba no paramétrica, de U de Mann-Whitney, se empleó para hacer las comparaciones entre las cepas (3xTg-AD vs nTg) por edad. Los resultados fueron considerados significativos si $P < 0.05$ para todas las pruebas.

7. RESULTADOS

7.1 Anidación

En la Figura 7, se muestran los resultados de la anidación, analizados con un de ANOVA de dos vías, en la cual no se encontraron diferencias significativas que se pudieran atribuir al factor edad ($F_{2,28} = 0.16$, $P = 0.85$) ni al factor de la cepa ($F_{1,28} = 1.10$, $P = 0.31$). Sin embargo, se encontraron diferencias significativas ($F_{2,28} = 7.0$, $P < 0.01$) producidas por la interacción de ambos factores (edad y cepa). La prueba *post hoc* de Bonferroni muestra que las diferencias significativas ($P < 0.05$) ocurrieron al comparar los animales transgénicos (3xTg-AD) en edades sintomáticas (12 y 18 meses) con el grupo asintomático de 3 meses de edad. La eficacia en la construcción del nido se redujo en un 30% en las etapas sintomáticas (12 y 18 meses) comparada con el grupo de animales de 3 meses de edad (etapa asintomática). De manera notable, los ratones no transgénicos (nTg) de 3 meses de edad mostraron un menor desempeño en la construcción y calidad de nido, con una deficiencia del 40%, en comparación con los 3xTg-AD asintomáticos de la misma edad. No hay una diferencia notable entre los otros grupos de 12 y 18 meses 3xTg-AD comparados con los nTg de la misma edad.

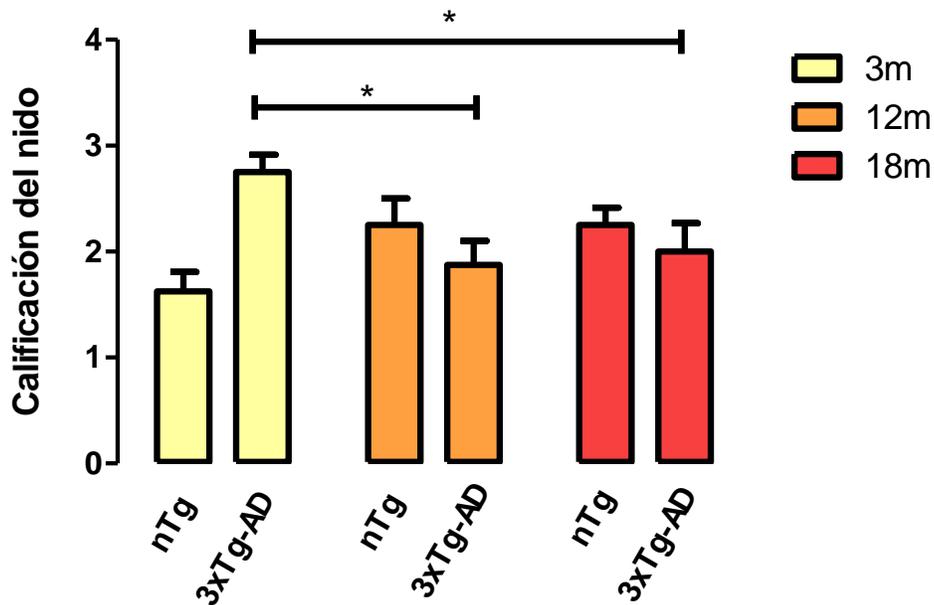


Figura 7. Calificación del nido. La gráfica muestra las calificaciones de la eficiencia y calidad de la construcción del nido con escala del 1 al 3. Los valores presentados son: la media \pm EE. El asterisco (*) indica que el 3xTg-AD de 3 meses, construyó un nido significativamente ($P < 0.05$) mejor (calificación 3) en relación a las edades sintomáticas de 12 y 18 meses de edad (calificación 2). El número de animales fue igual a 8 en todos los grupos.

7.2 Reconocimiento de objetos por ubicación (ROU)

El ANOVA de dos vías (Figura 8) compara el tiempo de exploración de los grupos en la fase de entrenamiento donde se observó que hay efecto de la edad ($F_{2,28} = 6.8$, $P < 0.01$) pero no hay efecto de la cepa ($F_{1,28} = 1.29$, $P = 0.27$) ni de la interacción entre ambos factores ($F_{2,28} = 0.96$, $P = 0.39$). La prueba *post hoc* de Bonferroni mostró que los ratones nTg de 12 meses exploran menos tiempo que aquellos de 3 meses de edad nTg ($P < 0.01$).

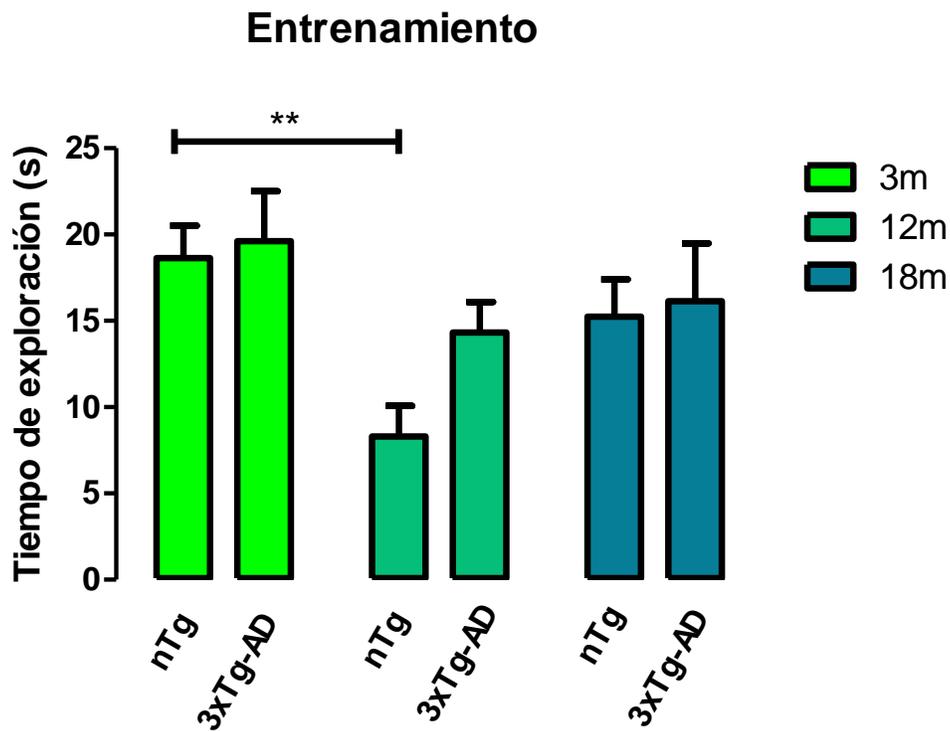


Figura 8. Tiempo de exploración de los ratones (3xTg-AD y nTg), en la fase de entrenamiento para la ubicación de los objetos. La grafica muestra las medias \pm EE. Los asteriscos (**) indican una disminución significativa ($P < 0.01$) del tiempo de exploración entre los grupos nTg de 3 meses vs 12 meses de edad. El número de animales fue igual a 8 en todos los grupos.

En la prueba de memoria de corto plazo (Figura 9), el ANOVA de 2 vías no mostró diferencias significativas causadas por alguno de los factores: edad ($F_{2,28} = 0.44$, $P = 0.64$), cepa ($F_{1,28} = 1.83$, $P = 0.20$) e interacción (edad x cepa) ($F_{2,28} = 0.30$, $P = 0.74$).

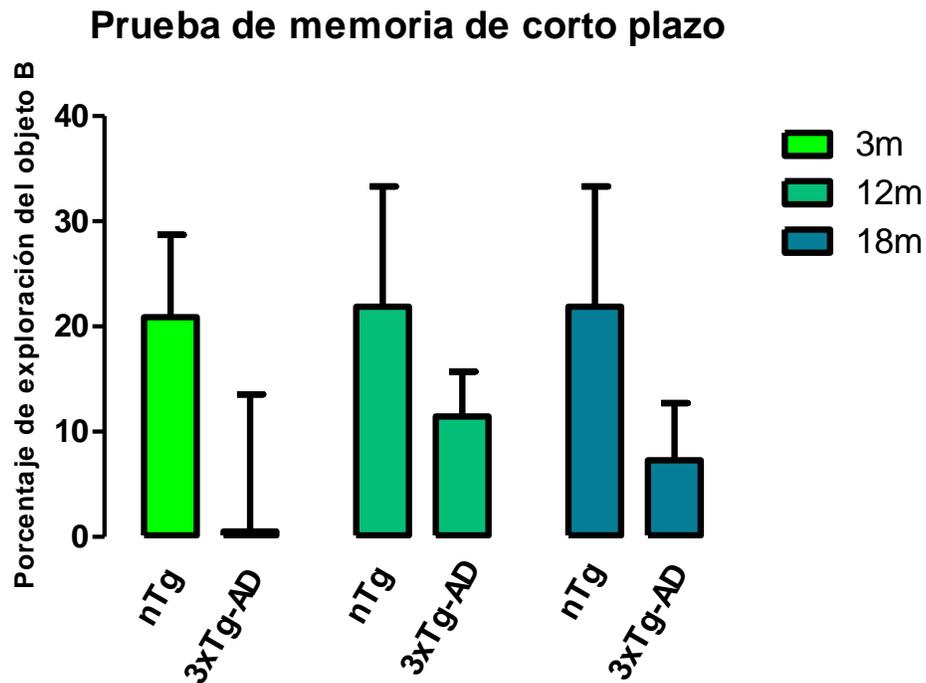


Figura 9. Tiempo de exploración, en la prueba de memoria de corto plazo del objeto B. La grafica muestra la media \pm EE en donde no se encontraron diferencias significativas (n= 8 por grupo).

La prueba de memoria de largo plazo (Figura 10), al no tener varianzas homogéneas, se usó un Kruskal-Wallis para comparar los grupos 3xTg-AD ($H_2= 0.58$, $P= 0.75$) y nTg ($H_2= 0.69$, $P= 0.71$) entre sí (factor edad). Se usó la U Mann-Whitney para comparar los grupos 3xTg-AD con los nTg por edades (factor cepa): 3 meses ($U= 25.00$, $P= 0.50$), 12 meses ($U= 30.00$, $P= 0.88$) y 18 meses ($U= 29.00$, $P= 0.80$). Los resultados no mostraron diferencias significativas en las pruebas.

Prueba de memoria de largo plazo

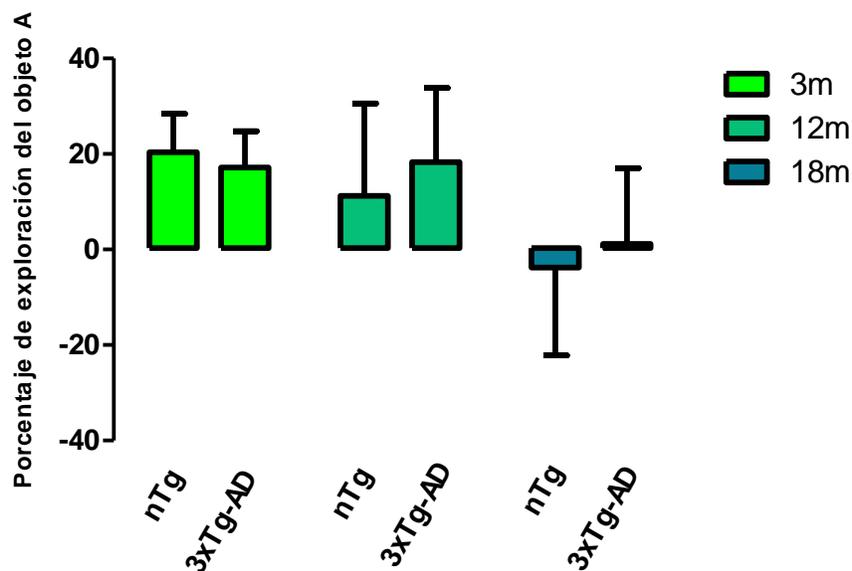


Figura 10. Tiempo de exploración, en la prueba de memoria de largo plazo del objeto A. La gráfica muestra la media \pm EE en donde no se encontraron diferencias significativas ($n=8$ por grupo). Nótese que el nTg de 18 meses mostró un porcentaje de exploración negativo.

7.3 Determinación de Cu

Antes de la determinación del Cu en el cerebro, se realizó una curva de calibración con una solución estándar con una concentración definida de Cu (Figura 11).

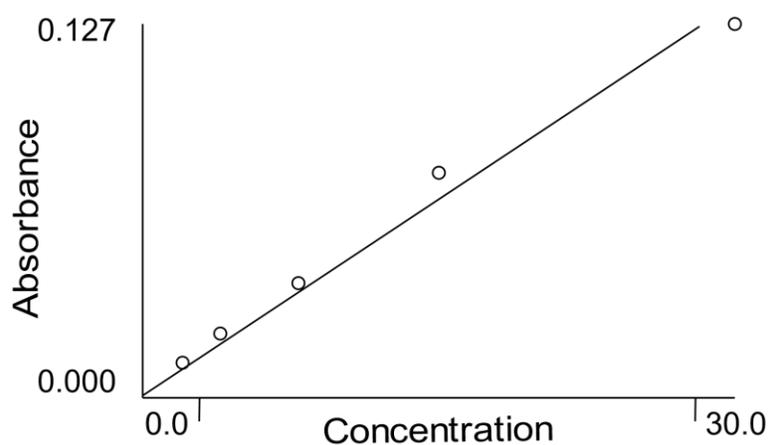


Figura 11. Curva de calibración para la concentración de Cu. Se observa una correlación de 0.9911, entre la absorbancia ($\lambda=324.8$) y la concentración ($\mu\text{g/L}$), lo que indica que el equipo está bien calibrado.

7.3.1 Determinación de Cu libre en el hipocampo

Para el analizar la concentración de Cu libre en el hipocampo (Figura 12), se realizó un Kruskal-Wallis, dado que no hubo homogeneidad de varianzas, para comparar los 3xTg-AD ($H_2= 0.56$, $P= 0.76$) y nTg ($H_2= 3.44$, $P= 0.18$) entre sí; para comparar las cepas se usó U de Mann-Whitney para comparar los grupos por edades.

Al comparar entre las edades: 3 meses ($U= 8.00$, $P= 0.90$), 12 meses ($U= 25.00$, $P= 0.78$) y 18 meses ($U= 3.00$, $P <0.05$), se observa que hay más Cu libre en los ratones 3xTg-AD de 18 meses ($P <0.05$), comparados con su control de la misma edad (Figura 12).

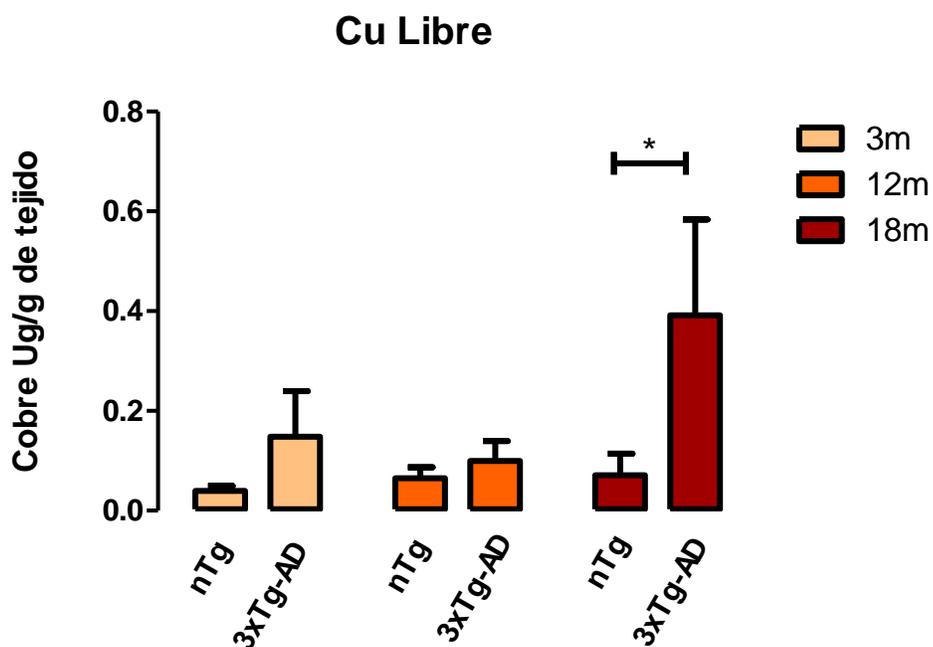


Figura 12. Concentración de Cu libre, expresada en µg de Cu por g de tejido, en el hipocampo de los ratones nTg y 3xTg-AD. La gráfica muestra la media \pm EE. El asterisco (*) indica un aumento significativo ($P < 0.05$) de Cu en el grupo 3xTg-AD de 18 meses comparado con el nTg de la misma edad. En cada grupo fue diferente el número de animales: para los 3 meses de edad fueron 9 (nTg= 3 y 3xTg-AD= 6); para los 12 meses fueron 15 (nTg= 8 y 3xTg-AD=7) y para los 18 meses 11 (nTg= 5 y 3xTg-AD= 6).

7.3.2 Determinación de Cu unido en el hipocampo

Para analizar la concentración de Cu unido a proteínas (Figura 13), se realizó un Kruskal-Wallis para comparar el grupo 3xTg-AD ($H_2= 2.4$, $P= 0.30$) y nTg ($H_2= 0.16$, $P= 0.92$) entre sí (factor edad), en donde no se encontraron diferencias significativas. Para probar el factor cepa se realizó U de Mann-Whitney para comparar los grupos por edades: 3 meses ($U= 9.00$, $P= 1.00$), 12 meses ($U= 14.00$, $P= 0.12$) y 18 meses ($U= 7.00$, $P= 0.18$). A pesar de que no hay diferencias significativas comparando los ratones de 18 meses nTg vs los ratones 3xTg-AD de la misma edad, se observa la tendencia de que el Cu aumentó 5 veces más en los ratones 3xTg-AD de 18 meses en comparación de los nTg de la misma edad.

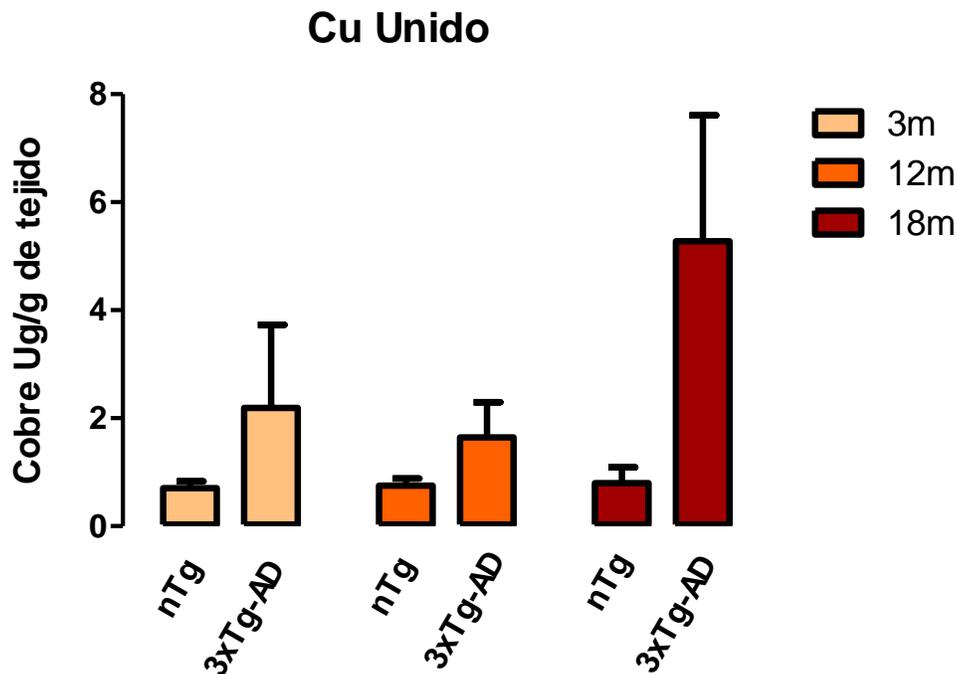


Figura 13. Concentración de Cu asociado a proteínas, expresada en μg de Cu por g de tejido, en el hipocampo de los ratones nTg y 3xTg-AD. La gráfica muestra la media \pm EE. En cada grupo fue diferente el número de animales: para los 3 meses de edad fueron 9 (nTg= 3 y 3xTg-AD= 6); para los 12 meses fueron 15 (nTg= 8 y 3xTg-AD=7) y para los 18 meses 11 (nTg= 5 y 3xTg-AD= 6).

7.4 Determinación de la actividad de SOD

Se realizó una ANOVA de dos vías con logaritmos para comparar los grupos (dado que no había homogeneidad de varianzas). Se observó que la actividad de SOD (Figura 14) fue influenciada por la EA ($F_{2,20} = 5.38$, $P < 0.05$) y por la interacción de la edad con la EA ($F_{2,20} = 15.14$, $P < 0.001$) pero no por el factor de la edad por sí sólo ($F_{1,20} = 0.88$, $P = 0.36$). Con la prueba *post hoc* se encontró que había diferencias significativas al comparar los grupos 3xTg-AD de 3 meses vs 12 meses y los grupos 3xTg-AD de 12 meses vs 18 meses ($P < 0.001$) y los grupos de 12 meses y 18 meses nTg ($P < 0.05$). También, en la Figura 14 se observa que a los 3 meses de edad no hay diferencia en la actividad de SOD entre los grupos nTg y 3xTg-AD. A los 12 meses de edad, en el caso de los 3xTg-AD, hay un aumento significativo ($P < 0.001$) en la actividad de SOD. En el caso de los 3xTg-AD, ocurre un aumento significativo ($P < 0.05$) a los 18 meses de edad. A los 12 meses en los ratones nTg, disminuye en un 50% la actividad de SOD con respecto con los ratones de 3 meses, mientras que, a los 18 meses de edad, en los ratones nTg la actividad de SOD aumenta en un 70% con respecto a los ratones de 12 meses. En el caso de los 3xTg-AD, el aumento de la actividad de SOD aumenta a los 12 meses de edad en un 80% en comparación con los ratones 3xTg-AD de 3 meses y a los 18 meses, la actividad de SOD se reduce en un 70% con respecto a la actividad observada a los 12 meses de edad.

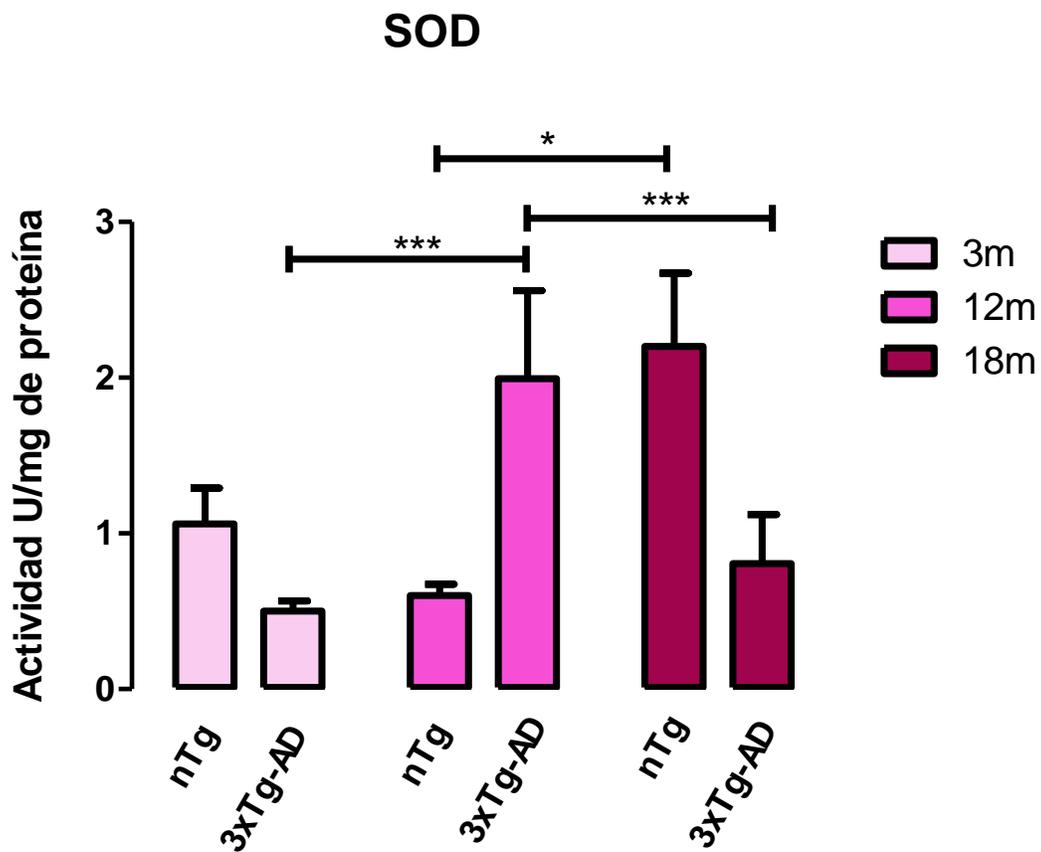


Figura 14. Actividad de la SOD, en el hipocampo, expresada en unidades de actividad (U) por mg de proteína en ratones nTg y 3xTg-AD. La gráfica muestra la media \pm EE. El asterisco (*) muestra un aumento significativo ($P < 0.05$) entre el grupo nTg de 12 meses vs el de 18 meses, Los tres asteriscos (***) indican un aumento significativo ($P < 0.001$) entre los grupos 3xTg-AD de 3 meses con el de 12 meses de edad y una disminución significativa ($P < 0.001$) entre los grupos 12 vs 18 meses 3xTg-AD. En cada grupo fue diferente el número de animales: para los 3 meses de edad fueron 10 (nTg= 5 y 3xTg-AD= 5); para los 12 meses fueron 7 (nTg= 2 y 3xTg-AD=5) y para los 18 meses 9 (nTg= 5 y 3xTg-AD= 4).

8. DISCUSIÓN

En el presente, trabajo evaluamos el cobre (Cu) libre y unido a proteínas en el hipocampo del modelo murino (3xTg-AD) para la enfermedad de Alzheimer; con base en la propuesta de que la fracción de Cu libre en el suero puede ser usada para un diagnóstico temprano de la patología (en etapa asintomática de la EA). Como lo propone Boll et al. desde el 2008, encuentran el Cu alterado en la etapa avanzada de la EA, a causa del aumento en el estrés oxidativo (EO) y en donde no cumple correctamente con su funcionamiento como cofactor de la enzima superóxido dismutasa (SOD) para la reducción del ion superóxido.

Por otra parte, uno de los síntomas tempranos observables en la EA, en el humano, es la disminución de la capacidad de realizar tareas cotidianas diarias las que, conforme avanza la edad, se vuelven más difíciles de realizar (Mioshi et al., 2007). Se consideró en este modelo que, además de los síntomas y características histológicas y fisiológicas de la enfermedad, las conductas normales innatas y no invasivas como la anidación y la tarea de reconocimiento de objetos por ubicación, nos permitirían la visualización de la ventana de tiempo donde comienzan a presentarse los primeros síntomas. En el caso de la anidación, es una conducta que advierte acerca del bienestar del animal en su casa habitación y se altera cuando hay una atrofia en el hipocampo (Deacon, 2006). Esta conducta es natural y representa una función ejecutiva de construir un nido como protección. Nuestros resultados muestran que en esta prueba conductual que no hubo diferencias significativas cuando se efectúan las comparaciones entre los grupos transgénicos (3xTg-AD) sintomáticos y asintomáticos con su respectivo control, esto ha sido reportado en 2012, por Filali et al., quienes sometieron hembras 3xTg-AD a una batería de pruebas cognitivas comparados con los no transgénicos cuyo fondo genético es de presenilina, y en específico, no hubo diferencias significativas en la construcción de nido. En este estudio probamos que tampoco los machos 3xTg-AD jóvenes en fase asintomática (3 meses de edad) ni en la fase sintomática (12 y 18 meses), mostraron diferencias en la construcción del nido, probablemente esta conducta se preserva gracias a la plasticidad adaptativa del hipocampo, por un lado

y por el otro, el estado de confort en sus casas habitación que fueron controladas de manera similar en ambos grupos. Además, los resultados obtenidos muestran que los ratones 3xTg-AD, en la etapa asintomática construyeron mejores nidos que su control no transgénico (nTg) de la misma edad. Lo anterior puede deberse a que su control, el ratón nTg, viene de una mezcla derivada del 129 y el fondo genético puede variar causando alteraciones en su desempeño conductual (Simpson et al., 1997). Las primeras observaciones en el laboratorio indicaron esta tendencia de nidos construidos de manera similar entre los ratones nTg y los 3xTg-AD, por lo que, desde estudio previos (Orta et al., 2013), se ajustaron las calificaciones a 3 medidas en lugar de las 5 propuestas por Deacon et al. (2002). Es importante mencionar que estas 5 calificaciones en la construcción del nido se reportan en el ratón negro de la cepa C57 ya que se refiere a él como el mejor ratón para la ejecución de dicha tarea. Sin lugar a dudas, el factor edad, junto con la patología interviene en la calidad de la construcción del nido, evidenciado por las diferencias significativas entre el grupo joven de 3 meses con los de 12 y 18 meses de edad en el 3xTg-AD; al igual que se observa que, en la medida que avanza la enfermedad, la conducta de anidación de los ratones transgénicos se asemeja a la de los nTg (Figura 7).

Otros síntomas tempranos de la EA se encuentran relacionados con otra de las funciones importantes del hipocampo tal como la ubicación espacial y el reconocimiento de objetos por ubicación (ROU) que informa sobre la función del hipocampo en relación a la ubicación de las señales externas, reguladas por las células de lugar presentes en el hipocampo asociadas a la complementación de patrones (Carasatorre et al., 2015). Los pacientes con la EA presentan desubicación espacial, una pobre capacidad para relacionar el contexto y un objeto (Kessels, 2010). En el entrenamiento se midió el tiempo de exploración de ambos objetos (Figura 8). Se observó que los ratones de 12 meses nTg tienden a explorar menos que sus pares transgénicos de la misma edad. Tanto en la prueba de memoria de corto plazo (Figura 9) como de largo plazo (Figura 10) se observó que no hay diferencias significativas entre ninguno de los grupos ya que la variabilidad es muy alta, pero se pueden apreciar ciertas tendencias: en la prueba de memoria de corto

plazo se puede ver que los grupos de ratones 3xTg-AD tienen un desempeño que tiende a ser menor a los grupos nTg. Por otro lado, en la prueba de memoria de largo plazo se observa que los ratones de 12 meses de edad 3xTg-AD tienden a desempeñar la tarea con menor eficacia que el grupo control nTg. Probablemente, si se aumentase el número de animales en los grupos se podría apreciar una diferencia significativa entre ambos grupos.

La tendencia de los grupos de ratones de 18 meses de edad a desempeñarse pobremente en la tarea de ROU, en la prueba de memoria de largo plazo se puede deber al efecto de la edad, como se observó de manera similar en un estudio de Murai (2007) en ratones CD1, machos de 17-18 meses, su desempeño en la tarea era menor al de aquellos de 8 meses. Por otro lado, los resultados obtenidos en esta tarea concuerdan con aquellos realizados por el grupo de Davis (2013) que realizó la prueba de ROU con 12 hembras 3xTg-AD de 11 meses de edad y sus respectivos controles y encontró que no había diferencias significativas entre el grupo control y el transgénico, pero se observó, al igual que en nuestro estudio, una tendencia en el grupo control a desempeñarse mejor que el transgénico. Tomando en cuenta lo anterior, es posible que la conducta de ROU no es suficientemente sensible, por lo que se tendría que contar con más sujetos en los grupos.

Dado que las pruebas cognitivas y conductuales sólo ofrecen una pista, pero no una valoración confiable para la detección de la EA, se ha propuesto como diagnóstico preventivo la medición de Cu libre en suero de los pacientes de Alzheimer ya que este se ha relacionado con el déficit cognitivo en etapas tempranas de la enfermedad (Squitti et al., 2014), así pues, es importante observar si hay cambios en la fracción de Cu libre en el modelo murino usado puesto que ofrece una ventana de oportunidad que permita intervenciones adecuadas, que puedan ser aplicadas en la fase asintomática de la EA. Asimismo, en este estudio las mediciones de las diferentes fracciones de Cu mostraron que la cantidad de Cu unido a proteínas en ratones 3xTg-AD de 18 meses de edad tiende a ser mayor que los de 12 meses de edad.

En estudios realizados con cerebros humanos y ratones APP/PS1 (James et al., 2012) se reportó que la fracción de Cu “lábil” se encuentra aumentada. En los ratones se observó un incremento de dicha fracción a los 6 y 13 meses de edad a diferencia de los ratones 3xTg-AD de 12 meses de edad de nuestro experimento, donde se observó que la fracción de cobre libre tiende a disminuir. Por otro lado, a los 18 meses de edad, la fracción de Cu libre aumenta en comparación con el control (Figura 12). A los 18 meses de edad, el Cu unido a proteínas tiende a aumentar probablemente debido a que parte del Cu se encuentra asociada a la proteína β A. Lo cual explicaría la tendencia del aumento de Cu en el hipocampo del ratón. Se ha encontrado en estudios con inmunofluorescencia de rayos X que en modelos murinos de 3 a 12 meses de edad hay una tendencia de niveles elevados de Cu en el hipocampo en comparación con sus controles y, a partir de los 18 meses, se observa que los niveles de los controles aumentan (Eskici & Axelsen, 2012) esto coincide con los resultados obtenidos de Cu en el hipocampo a pesar que en nuestros controles el aumento en la cantidad de Cu libre y asociado no se da. En un estudio (Wang et al., 2012) realizado con ratones transgénicos APP/V17I y sus respectivos controles de 1, 3, 12 y 18 de edad se observó la micro-distribución del Cu en cortes coronales, por medio de radiación sincrónica de micro-fluorescencia de rayos X (SR- μ XRF), se mostró que había un aumento de Cu en ambos tipos de ratones con el aumento de la edad y se observó en el hipocampo de los ratones transgénicos con respecto a los controles, esta tendencia se observa, nuevamente en la cantidad de Cu en los resultados obtenidos de nuestro estudio. Así, la determinación de ambas formas (libre y asociado a proteínas del Cu) indicaría que es posible que el Cu no sea transportado de manera adecuada en el organismo, dado que, por la patología, el desbalance de los metales puede impactar no sólo en el inicio de la enfermedad sino también en su progreso. El Cu provoca EO dado que contribuye a la producción de radicales libres (Manto, 2014) asociado a los iones nocivos como el superóxido (O_2^-) el cual también induce la producción de radicales libres.

Una de las funciones del Cu es su papel como cofactor de algunas enzimas, como superóxido dismutasa (SOD); esta enzima actúa como uno de los principales mecanismos de defensa contra el EO provocado por el ion O_2^- . En la medición de la actividad de SOD realizada en este estudio, se encontró que, en los animales de 12 meses de edad, la actividad de la SOD se aumentó en los 3xTg-AD, mientras que, en los nTg, el aumento de la actividad de SOD se observó hasta los 18 meses. Por lo tanto, se considera que el cambio en la actividad de la SOD es dependiente de la edad y del diseño experimental que se use. Lo anterior coincide con los estudios *post mortem* de cerebros de pacientes con la EA (Richardson et al., 1993) en donde la actividad de la enzima SOD se encuentra reducida al igual que los 3xTg-AD de 18 meses de edad que ya se encuentran en una fase muy avanzada de la enfermedad. Suponemos que el aumento de la actividad de SOD, en el 3xTg-AD, a los 12 meses se deba a un mecanismo de defensa ante el estrés oxidativo y la reducción de la actividad de la SOD, a los 18 meses de edad, sea a causa de la avanzada edad y su interacción con la patología.

El presente estudio, propuesto en un modelo experimental homocigoto para la enfermedad del Alzheimer-3xTg-AD, aporta conocimiento de la relación funcional del hipocampo con respecto a las conductas innatas como la anidación (preservada) y la ubicación del organismo con su entorno (reconocimiento de objeto por ubicación-ROU), que de algún modo simula las condiciones de ubicación espacial de un enfermo de Alzheimer. Estas conductas son reguladas por el hipocampo en donde el estrés oxidativo es un síntoma temprano provocado por el desbalance del Cu, que forma parte de la cascada de eventos para producir el estrés oxidativo el cual en este estudio se vio alterado. Además, este desbalance de Cu (libre y asociado a proteínas) contribuye a la propuesta de su detección como diagnóstico temprano del Alzheimer para su correcto tratamiento. Asimismo, se requiere conocer la respuesta del desbalance del Cu en otras estructuras cerebrales que preservan las funciones integrales de sobrevivencia a pesar de la enfermedad. Faltarían, sin embargo, más estudios que abunden con respecto al efecto del estrés oxidativo con relación a la formación de las placas βA y de las redes neurofibrilares

en esta estructura (hipocampo) que, por ser plástica, es sensible a los cambios ambientales.

9. CONCLUSIONES

Se cumplió parcialmente la hipótesis de la anidación en el 3xTg-AD, ya que se encontraron diferencias en la eficiencia y calidad e la construcción del nido como resultado de la interacción de los factores edad y cepa, cuando se compararon entre los grupos sintomáticos (12-18 meses) con los asintomáticos (3 meses) quienes realizaron mejores nidos.

Por otro lado, los resultados de la tarea de reconocimiento de objeto por ubicación no coincidieron con la hipótesis ya sea porque esta tarea no fue suficientemente sensible para observar cambios en el modelo 3xTg-AD, o quizás por la alta plasticidad de adaptación del hipocampo en respuesta a factores del medio ambiente.

La fracción de Cu libre en el hipocampo aumenta en los ratones transgénicos con edad avanzada lo cual se puede relacionar con el progreso de la enfermedad en el modelo 3xTg-AD, lo cual replica el aumento de Cu libre en el suero presente en los humanos; aunque no se ha podido relacionar el deterioro cognitivo con la concentración de Cu en este animal.

Se adelantó el aumento de la actividad de SOD a causa de la enfermedad y de la edad en el 3xTg-AD. Sobre este fenómeno no se tiene una explicación, por lo que sería necesario observar con más detalle el resto de la cadena de estrés oxidativo, además de realizar una correlación entre la actividad de SOD y la cantidad de Cu libre en el hipocampo.

PERSPECTIVAS

Con base en este estudio se podría suponer que hay una alteración en el resto del cerebro en cuanto a las cantidades de Cu libre, Cu unido y actividad de SOD, por tanto, sería de interés observar estas alteraciones en el resto del cerebro y relacionarlas con la presencia de placas β A.

10. REFERENCIAS

- Alzheimer A. (1906) Über einen eigenartigen schweren Erkrankungsprozeß der Hirnrinde. *Neurologisches Centralblatt*, 23: 1129–1136.
- Alzheimer Association (2015), *Latinos y el Alzheimer*, (última consulta: 27/10/2015) http://www.alz.org/espanol/about/latinos_y_el_alzheimer.asp
- Angeletti B., Waldron K.J., Freeman K.B., Bawagan H., Hussain I., Miller C.J., Lau K. et al. (2005) BACE1 Cytoplasmic domain interacts with the copper chaperone for superoxide dismutase-1 and binds copper. *The Journal of Biological Chemistry*, 280: 17930-17937.
- Apostolova L.G., (2016) Alzheimer Disease. *Continuum*. 22: 419-434.
- Armendariz A.D., González M., Loguinov A.V. & Vulpe C.D. (2004) Gene expression profiling in chronic copper overload reveals upregulation of *Prnp* and *App*. *Physiological Genomics*, 20: 45-54.
- Armstrong R.A. (2013) What causes Alzheimer's disease? *Folia Neuropathologica*, 51:169-188.
- Baguña T.J., Adreozzi E.M., Dunn J.T., Siddique M., Szanda I., Howlett D.R. et al. (2017) PET Imaging of copper trafficking in a mouse model of Alzheimer disease. *Journal of Nuclear Medicine*, 57: 109-114.
- Balamurugan K. & Schaffner W. (2006) Copper homeostasis in eukaryotes: Teetering on a tightrope. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Cell Research*, 1763: 737-746.
- Bellingham S.A., Lahiri D.K., Maloney B., La Fontaine S., Multhaup G. & Camakaris J. (2004) Copper depletion Down-regulates expression of the Alzheimer's disease amyloid- β precursor gene. *The Journal of Biological Chemistry*, 279: 20378-20386.
- Bilings L.M., Oddo S., Green K.N., McLaugh J.L., LaFerla F.M. (2005) Intraneural A β causes the onset of early Alzheimer's disease-related cognitive deficits in transgenic mice. *Neuron*, 45:675-688.
- Bogdanovic N., Zilmer M., Zilmer K., Rehema A. & Karelson E. (2001) The swedish APP670/671 Alzheimer's disease mutation: the first evidence for strikingly increased oxidative injury in the temporal inferior cortex. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*. 12: 364-370.
- Boll MC., Alcaraz-Zubeldia A., Montes S. & Rios C. (2008) Free copper, ferroxidase and SOD1 activities, lipid peroxidation and NO $_x$ content in the CSP. A different marker profile in four neurodegenerative diseases. *Neurochemical Research*, 33: 1717-1723.
- Box G.E.P. (1953) Non-normality and tests on variances. *Biometrika*, 40: 318-335.

- Bradley-Whitman M.A., Timmons M.D., Beckett T.L., Murphy M.P., Lynn B.C. & Lovell M.A. (2014) Nucleic acid oxidation: an early feature of Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry*, 128: 294-304.
- Brewer G.J. (2008) The risks of free copper in the body and the development of useful anticopper drugs. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 11: 727-732.
- Broadbent N.J., Squire L.R. & Clark R.E. (2004) Spatial memory, recognition memory, and the hippocampus. *PNAS*. 10: 14515-14520.
- Bucossi S., Vnetriglia M., Panetta V., Salustri C., Pasqualetti P., Mariani S. et al. (2011) Copper in Alzheimer's Disease: A meta-analysis of serum, plasma and cerebrospinal fluid studies. *Journal of Alzheimer's disease*, 24: 175-185.
- Bush A.I. & Tanzi R.E., (2008). Therapeutics for Alzheimer's disease based on the metal hypothesis. *Neurotherapeutics*, 5: 421-432.
- Carasatorre M., Ochoa-Alvarez A., Velázquez-Campos G., Lozano-Flores C., Ramírez-Amaya V, Díaz-Cintra, S.Y. (2015) Hippocampal synaptic expansion induced by spatial experience in rats correlates with improved information processing in the hippocampus. *PLoS ONE*. 10: e0132676.
- Castellani R.J., Rolston R.K. & Smith M.A. (2010) Alzheimer Disease. *National Institutes of Health*. 56: 484-546.
- Clausen A., Xu X., Bi X. & Baudry M. (2012) Effects of the superoxide dismutase/catalase mimetic EUK-207 in a mouse model of Alzheimer's disease: Protection against and interruption of the progression of amyloid and tau pathology and cognitive decline. *Journal of Alzheimer's disease*, 30:183-208.
- Davis K.E., Easton A., Eacott M.J. & Gigg J. (2013) Episodic-like memory for what-where-which occasion is selectively impaired in the 3xTgAD mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease*, 33: 681-698.
- Deacon R. M. J. (2006) Assessing nest building in mice. *Nature Protocols*, 3: 1117-1119.
- Deacon R.M.J., Croucher A. & Rawlins N.P. (2002) Hippocampal cytotoxic lesion effects on species-typical behaviors in mice. *Behavioral Brain Research*, 132: 203-213.
- Desai V.& Kaler S. (2008) Role of copper in human neurological disorders 1-3. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 88: 855-858.
- Donnelly P.S., Xiao Z. & Wedd A.G. (2007) Copper and Alzheimer's disease. *Current Opinion in Chemical Biology*, 11: 128-133.
- Drago D., Cavaliere A., Ciavardelli D., Di Ilio C., Zatta P. & Sensi S.L. (2008) Functioning and is Altered in a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Rejuvenation Research*, 11: 861-871.

- Duce J. & Bush A.I. (2010). Biological metals and Alzheimer's disease: Implications for therapeutics and diagnostics. *Progress in Neurobiology*, 92: 1-18.
- Eskici G. & Axelsen P.H. (2012) Copper and oxidative stress in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry*, 51: 6289-6311.
- Ennaceur A. & Delacour J. (1988) A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behavioral Brain Research*, 31: 47-59.
- Etherton M.R., Blaiss C.A., Powell C.M. & Südhof T.C. (2009) Mouse neurexin-1 α deletion causes correlated electrophysiological and behavioral changes consistent with cognitive impairments. *PNAS*, 106: 17998-18003.
- Filali M., Lalonde R., Theriault P., Julien C., Calon F. & Planel E. (2012) Cognitive and non-cognitive behaviors in the triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease expressing mutated *APP*, *PS1*, and *Mapt* (3xTg-AD). *Behavioral Brain Research*, 234: 334-342.
- García-Mesa Y., Giménez-Llort L., López L.C., Venegas C., Cristòfol R., Escames G. et al. (2012) Melatonin plus physical exercise are highly neuroprotective in the 3xTg-AD mouse. *Neurobiology of Aging*, 33: 1124.e13-1124.e29.
- García-Mesa Y., Colie S., Corpas R., Cristòfol R., Comellas F., Nebreda A.R. et al. (2016) Oxidative stress is a central target for physical exercise neuroprotection against pathological brain aging. *The Gerontological society of America*, 71: 40-49.
- Garzon-Rodriguez W., Yatsimirsky A.K. & Glabe C.G. (1999) Binding of Zn(II), Cu(II), and Fe(II) ions to Alzheimer's A β peptide studied by fluorescence. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 9: 2243-2248.
- Gaskill B. N., Gordon C. J., Pajor E. A., Lucas J. R., Davis J. K. & Garner J. P. (2013) Impact of nesting material on mouse body temperature and physiology. *Physiology & Behavior*, 110-111: 87-95.
- Giménez-Llort L., Blázquez G., Cañete T., Johansson B., Oddo S., Tobeña A. et al. (2007) Modeling behavioral and neural symptoms of Alzheimer's disease in mice: A role for intraneuronal amyloid. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 31:125-147.
- Graeber M.B., Kösel S., Grasbon-Frodl E., Möller H.J., Mehraein P. (1998) Histopathology and APOE genotype of the first Alzheimer disease patient, Auguste D. *Neurogenetics*, 1: 223-229.
- Grundke-Iqbal I., Iqbal K., Tung Y. Quinlan M., Wisniewski H.M. & Binder L.I. (1986) Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein τ (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *PNAS*, 83: 4913-4917.
- Guengerich F.P. (2009) Thematic Series: Metals in Biology. *The Journal of Biological Chemistry*, 2: 709.

- Gupta A. & Lutsenko S. (2009) Human copper transporters: mechanisms, role in human diseases and therapeutic potential. *Future Medical Chemistry*, 1: 1125-1142.
- Gustafsson J.S., Ceasar R., Glasbey C.A., Blomberg A. & Rudemo M. (2004) Statistical exploration of variation in quantitative two-dimensional gel electrophoresis data. *Proteomics*, 4: 3791-3799.
- Haan J. B., Newman J. D. & Kola I. (1992) Cu/Zn superoxide dismutase mRNA and enzyme activity, and susceptibility to lipid peroxidation, increases with aging in murine brains. *Molecular Brain Research*, 13: 179-187.
- Hardy J.A. & Higgins G.A. (1992) Alzheimer's disease: The Amyloid Cascade Hypothesis. *Science*, 256: 84-185.
- Hare D.J., Rembach A. & Roberts B. (2016) The emerging role of metalloproteomics in Alzheimer's Disease Research. *Systems Biology of Alzheimer's Disease, 1303 of the Series in Molecular Biology* Chapter, 22: 379-389.
- Harrison W.W., Martin G., Netsky & Brown M.D. (1968) Trace elements in human brain: Copper, zinc, iron, and magnesium. *Clinica chimica acta*, 21: 55-60.
- Huang W., Zhang X. & Chen W. (2016) Role of oxidative stress in Alzheimer's disease (Review). *Biomedical Reports*, 4: 519-522.
- James S.A., Vlitakis I., Adlard P.A., Duce J.A., Maters C L., Chemy R.A. & Busch A.I. (2012) Elevated labile Cu is associated with oxidative pathology in Alzheimer disease. *Free Radical Biology & Medicine*, 52: 298-302.
- Janelins M.C., Mastrangelo M., Oddo S., LaFerla F., Federoff H.J. & Bowers W. (2005) Early correlation of microglial activation with enhanced tumor necrosis factor-alpha and monocyte chemoattractant protein-1 expression specifically within the entorhinal cortex of triple transgenic Alzheimer's disease mice. *Journal of Neuroinflammation*, 2: 23.
- Jirkof P. (2014) Burrowing and nest building behavior as indicators of well-being in mice. *Journal of Neuroscience Methods*, 234: 139-146.
- Johnson F. & Giulivi C. (2005) Superoxide dismutases and their impact upon human health. *Molecular Aspects of Medicine*, 26: 340-352.
- Kessels R.P.C., Rijken S., Bannings L., Es N. & Rikkert M. (2010) Categorical spatial memory in patients with mild cognitive impairment and Alzheimer dementia: Positional versus object-location recall. *Journal of the International Neuropsychological Society*, 16: 200-204.
- Lau L. & Brodney M. (2008) Therapeutic approaches for the treatment of Alzheimer's disease: An overview. *Top Medical Chemistry*, 2: 1-24.
- Lloret A., Fuchsberger T., Giraldo E. & Viña J. (2015) Molecular mechanisms linking amyloid β toxicity and Tau hyperphosphorylation in Alzheimer's disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 83: 186-191.

- Lovell M.A., Robetson J.D., Teesdale W.J., Campbell W.R., Markesbery W.R. (1998) Copper, iron and zinc in Alzheimer's disease senile plaques. *Journal of the Neurological Sciences*, 158: 47-52.
- Manto M. (2014) Abnormal copper homeostasis: Mechanisms and roles in neurodegeneration, *Toxics*. 2: 327-345.
- Maurer K., Volk S. & Gerbaldo H. (1997) Auguste D and Alzheimer's disease. *The Lancet*, 349: 1546-1549.
- McCord J.M. & Fridovich I. (1969) Superoxide Dismutase: An enzymic function for erythrocyte cuprein (Hemocuprein). *The Journal of Biological Chemistry*, 244: 6049-6055.
- Miller L.M., Wang Q., Telivala T.P., Smith R.J., Lanzirotti A., Miklossy J. (2005) Synchrotron-based infrared and X-ray imaging shows focalized accumulation of Cu and Zn co-localized with β -amyloid deposits in Alzheimer's disease. *Journal of Structural Biology*, 155: 30-37.
- Mioshi E., Kipps C.M., Dawson K., Mitchell J., Graham A. & Hodges J.R. (2007) Activities of daily living in frontotemporal dementia and Alzheimer disease. *Neurology*, 68: 2077-2084.
- Mondragón J.D., Celada-Borja C., Barinagarrementeria-Aldatz F., Burgo-Jaramillo M. & Barragán-Campos H. (2016) Hippocampal volumetry as a biomarker for dementia in people with low education. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders Extra*, 6: 486-499.
- Monein A.E.A. (2015) Oxidant/Antioxidant imbalance and the risk of Alzheimer's disease. *Current Alzheimer Research*, 12: 335-349.
- Murai T., Okuda S., Tanaka T. & Ohta H. (2007) Characteristics of object location memory in mice: Behavioral and pharmacological studies. *Physiology and Behavior*, 90: 116-124.
- Murray M.E., Graff-Radford N.R., Ross O.A., Petersen R.C., Duara R. & Dickson D.W. (2011) Neuropathologically defined subtypes of Alzheimer's disease with distinct clinical characteristics: A retrospective study. *Lancet Neurology*, 10: 785-796.
- Negus S.S., Neddenriep B., Altarifi A.A., Carroll F.I., Leitl M.D. & Miller L.L. (2015) Effects of ketoprofen, morphine, and kappa opioids on pain related depression of nesting in mice. *Pain*, 156: 1153-1160.
- Newton R.D. (1948) The identity of Alzheimer's disease and senile dementia and their relationship to senility. *Journal of Mental Science*, 94: 225-249.
- Oddo S., Caccamo A., Shepherd J.D., Murphy M.P., Golde T.E., Kaye R. et al. (2003) Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular A β and synaptic dysfunction. *Neuron*, 39: 409-421.

- Oddo S., Caccamo A., Kitazawa M., Tseng B.P. & LaFerla F.M. (2003b) Amyloid deposition precedes tangle formation in triple transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 24: 1063-1070.
- Oliveira A.M.M., Haw J.D., Abel T., Havekes R. (2010) Post-training reversible inactivation of the hippocampus enhances novel object recognition memory. *Journal of learning and memory*, 17: 155-160.
- Orta-Salazar E., Feria-Velasco A., Medina-Aguirre G.I. & Diaz-Cintra S. (2013) Morphological analysis of the hippocampal region associated with an innate behavior task in the transgenic mouse model (3xTg-AD) for Alzheimer disease. *Neurología*. 28: 497-502.
- Postma A., Kessels R.P.C. & Van Asselen M. (2008) How the brain remembers and forgets where things are: The neurocognition of object-location memory. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 32: 1339-1345.
- Que E.L., Domaile D.W. & Chang C.J. (2008) Metals in Neurobiology: Probing their chemistry and biology with Molecular Imaging. *Chemical Reviews*, 108: 1517-1549.
- Quinn J., Harris C., Kaye J., Lind B., Carter R., Anekonda T. & Ralle M. (2011) Gender effects on Plasma and brain copper. *International Journal of Alzheimer's disease*, 2011: 1-4.
- Resende R., Moreira P., Proença T., Deshpande A., Busciglio J., Pereira C. & Oliveira R. C. (2008) Brain oxidative stress in a triple-transgenic mouse model of Alzheimer disease. *Free Radical Biology & Medicine*, 44:2051-2057.
- Reséndiz, R., 2010, *Enfermedad de Alzheimer*, (última consulta: 27/10/2015).
- Richardson J. S. (1993) Free radicals in the genesis of Alzheimer's disease. *Annals New York academy of sciences*, 73-76.
- Rubio-Osornio M., Montes S., Heras-Romero Y., Guevara J., Rubio C., Aguilera P. et al. (2013) Induction of ferroxidase enzymatic activity by copper reduces MPP+- evoked neurotoxicity in rats. *Neuroscience Research*, 75: 250-255.
- Salustri C., Barbati G., Ghidoni R., Quintiliani L., Ciappina S., Binetti G. & Squitti R. (2010) Is cognitive function linked to serum free copper levels? A cohort study in a normal population. *Clinical Neurophysiology*, 121: 502-207.
- Sayre L.M., Smith M A. & Perry G. (2001) Chemistry and biochemistry of oxidative stress in neurodegenerative disease. *Current Medical Chemistry*, 8:721-738.
- Scheiber I., Mercer J. & Dringen R. (2014) Metabolism and functions of copper in brain, *Progress in Neurobiology*, 116: 33-57.
- Sensi S.L., Paolett P., Bush A.I. & Sckler I. (2009) Zinc in the physiology and pathology of the CNS. *Nature*, 10: 780-79.

- Simpson E.M, Linder C.C., Sargent E.E., Davisson M.T. Mobraaten L.E. & Sharp J.J. (1997) Genetic variation among 129 substrains and its importance for targeted mutagenesis in mice. *Nature Genetics*, 16: 19-27.
- Snaedal J., Kristinsson J., Gunnarsdóttir S., Ólafsdóttir Á., Baldvinsson M. & Jóhannesson T. (1998) Copper, ceruloplasmin and superoxide dismutase in patients with Alzheimer's disease. *Dementia and geriatric cognitive disorders*, 9: 239-242.
- Squitti R., Quattrocchi C., Del Frono G., Autuono P., Wekstein D., Capo C. et al. (2007) Ceruloplasmin (2-D PAGE) Pattern and copper content in serum and brain of Alzheimer disease patients. *Biomarker Insights*, 1:205-213.
- Squitti R., Quattrocchi C., Salustri C. & Rossini P. M. (2008) Ceruloplasmin fragmentation is implicated in 'free' copper deregulation of Alzheimer's disease. *Prion*, 2: 23-27.
- Squitti R., Ghidoni R., Siotto M., Ventriglia M., Benussi L., Paterlini A. et al. (2014) Value of serum nonceruloplasmin copper for prediction of mild cognitive impairment conversion to Alzheimer disease. *Annals of Neurology*, 75: 574-580.
- Tarohda T., Yamamoto M. & Amamo R. (2004) Regional distribution of manganese, iron, copper, and zinc in the rat brain during development. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 380: 240-246.
- Tegoni M., Valensi, D., Toso L. & Remelli M. (2014) Copper chelators: Chemical properties and Bio-medical applications. *Current Medicinal Chemistry*, 21: 3787-3818.
- Thompson P.M., Hayashi K.M., De Zubicaray G.I., Janke A.L., Rose S.E., Semple J. et al. (2004) Mapping hippocampal and ventricular change in Alzheimer disease. *NeuroImage*, 22: 1754-1766.
- Uriu-Adams J.Y. & Keen C.L. (2005) Copper, oxidative stress, and human health. *Molecular Aspects of Medicine*, 26: 268-298.
- Vogel-Ciernia A. & Wood M. (2014) Examining object location and object recognition memory in mice. *Current Protocols of Neuroscience*, 69: 8.31.1-8.31.17.
- Wang H., Wang M., Wang B., Li M., Chen H., Yu X. et al. (2012) The distribution profile and oxidation states of biometals in APP transgenic mouse brain: dyshomeostasis with age and as a function of the development of Alzheimer's disease. *Metallomics*, 4: 289-296.
- Wilson D.I.G., Langston R.F., Schlesiger Wagner, M., Watanabe S. & Ainge J.A. (2013) Lateral entorhinal cortex is critical for novel object-context recognition. *Hippocampus*, 23: 352-366.

- White A.R., Multhaup G., Maher F., Bellingham S., Camakaris J., Zheng H. et al. (1999) The Alzheimer's disease amyloid precursor protein modulates copper-induced toxicity and oxidative stress in primary neuronal cultures. *The Journal of Neuroscience*, 19: 9170-9179.
- White A.R., Kanninen K. & Crouch P.J. (2015) Editorial: Metals and neurodegeneration: restoring the balance. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 7: 1-2.
- Zatta P., Drago D., Bolognin S. & Sensi S.L. (2009) Alzheimer's disease, metal ions and metal homeostatic therapy. *Trends in Pharmacological Sciences*, 30: 346-355.

FIGURAS

Figura 1. Diferencia de un cerebro sano y uno con padecimiento de Alzheimer.....	6
Figura 2. Modelo murino para Alzheimer, 3xTg-AD por Oddo et al.....	8
Figura 3. Ingreso y transporte de Cobre en la neurona.....	14
Figura 4. Distribución de la concentración de Zn, Cu, Fe y Mn en el cerebro de la rata durante el desarrollo	16
Figura 5. Escala de Calificación del nido.....	25
Figura 6. Representación esquemática de la conducta de ROU.....	26
Figura 7. Calificación del nido..	30
Figura 8. Tiempo de exploración de los ratones (3xTg-AD y nTg), en la fase de entrenamiento	31
Figura 9. Tiempo de exploración, en la prueba de memoria de corto plazo.....	32
Figura 10. Tiempo de exploración, en la prueba de memoria de largo plazo	33
Figura 11. Curva de calibración para la concentración de Cu.....	33
Figura 12. Concentración de Cu libre.....	34
Figura 13. Concentración de Cu asociado a proteínas.	35
Figura 14. Actividad de la SOD, en el hipocampo	37