



UNIVERSIDAD DE MURCIA
FACULTAD DE MEDICINA

**Deterioro Cognitivo Inducido por
Privación de Sueño: Efecto de la Edad y
el Tratamiento con Memantina**

D. Ernesto Tarragón Cros
2013



**UNIVERSIDAD DE MURCIA
DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA HUMANA Y PSICOBIOLOGÍA
FACULTAD DE MEDICINA**

**DETERIORO COGNITIVO INDUCIDO POR
PRIVACIÓN DE SUEÑO: EFECTO DE LA EDAD Y
EL TRATAMIENTO CON MEMANTINA**

TESIS DOCTORAL

Realizada por:

ERNESTO TARRAGÓN CROS

Dirigida por:

Dra. MARÍA TRINIDAD HERRERO EZQUERRO

Dra. ANA MARÍA GONZÁLEZ CUELLO

Dr. FRANCISCO FERMÍN TOLEDO ROMERO

PROGRAMA DE DOCTORADO EN ENVEJECIMIENTO



D^a. María Trinidad Herrero Ezquerro , Catedrática de Universidad del Área de Anatomía en el Departamento de Anatomía humana y Psicobiología, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "Deterioro cognitivo inducido por privación de sueño: efecto de la edad y el tratamiento con memantina", realizada por D. Ernesto Tarragón Cros, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 13 de marzo de 2013



D^a. Ana María González Cuello, Doctora de Universidad del Área de Enfermería en el Departamento de Enfermería, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "Deterioro cognitivo inducido por privación de sueño: efecto de la edad y el tratamiento con memantina", realizada por D. Ernesto Tarragón Cros, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 13 de marzo de 2013



D. Francisco Fermín Toledo Romero , Doctor de Universidad del Área de Psiquiatría en el Departamento de Psiquiatría y Psicología Social, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "Deterioro cognitivo inducido por privación de sueño: efecto de la edad y el tratamiento con memantina", realizada por D. Ernesto Tarragón Cros, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 13 de marzo de 2013

**A mis padres y hermanos.
A mi persona favorita en todo el mundo.**

Echando la vista atrás, son muchas las personas que me vienen a la memoria por haberme acompañado de una u otra forma durante el proceso de elaboración de esta tesis. Y creo que todas ellas merecen una mención.

En primer lugar, a mis directores de tesis: Ana, Paco y, en especial, Trini, por haberme dado la oportunidad de realizar la que era una de mis mayores ilusiones: la tesis doctoral. Gracias por la orientación, tutela y paciencia que me habéis brindado desde el momento en que este proyecto comenzó a andar. Ha sido un placer y una satisfacción haber tenido a mi disposición vuestro conocimiento y ayuda, y me siento privilegiado por haber podido compartir con vosotros las fases de este trabajo que ahora termina.

En segundo lugar, a mis compañeros de laboratorio: Carmen María, Aurora, José Enrique, Cristina, Víctor, Lola y Paco. Desde el día en que llegué a Murcia y les conocí me acogieron sin reservas y me mostraron lo fantásticas personas que son. No ha habido ni un solo momento en que no hayan estado ahí cuando les he necesitado. Siempre es complicado adaptarse a un entorno nuevo, y si no llega a ser por ellos, este periodo hubiera sido mucho más difícil de sobrellevar. Gracias por las charlas, discusiones y reflexiones con las que tanto he disfrutado. A vosotros: Paco, José Enrique y Víctor, porque no recuerdo ocasión en que no hayáis tenido un momento para hablar y ofrecerme vuestro consejo y guía cuando la he necesitado. Carmen María y Aurora, me habéis ayudado a que sienta el laboratorio no sólo como un lugar de trabajo, sino como un sitio donde realmente me encuentre a gusto. Cristina, porque haces que me exija cada día y me replantee cada paso, lo que considero fundamental en este oficio. Y a ti Lola, que empezamos en este grupo al mismo tiempo, y a quien he terminado por considerar más una amiga que una compañera de trabajo.

Gracias también a mis antiguos compañeros y amigos de la *Universitat Jaume I*. Con ellos di mis primeros pasos y me siento en gran deuda con la gente que allí permanece: Carlos, Mercé, Marta, Carla, Raúl y Laura, por ser los primeros modelos en los que inspirarme.

A Marta, María, Alicia, Loly, Juan Carlos, Pablo y Lau, por convertirnos en mi segunda casa, ayudarme y apoyarme. Todos y cada uno me aportáis algo cada vez que hablamos y siempre os guardaré un sitio en mi memoria por todos los ratos y experiencias que hemos pasado, tanto dentro como fuera del laboratorio.

Es muy gratificante que la gente con la que compartes el día a día en tu lugar de trabajo sean capaces de hacerte olvidar por momentos que realmente estás trabajando de lo a gusto que te encuentras. Pero al final del día, en los momentos más difíciles (que los hay) vas a resguardarte bajo el paraguas de las personas que forman parte de tu vida en otros aspectos más allá del devenir diario. Así pues, quiero dar también las gracias a mis amigos y familia. En

mi caso, estas dos categorías se confunden muchas veces, ya que soy lo suficientemente afortunado por tener amigos a los que considero mi familia, y familiares a los que tengo entre mis amigos. Gracias a todo el *Calabazas Club* (Royo, Lluís, Yuste, Rafa, Luis, Javi, Manu, Fran, Julio, Pablo, Ito, Simón, Paco, Jacobo y David), a toda la *PCJ* (Nico, Héctor, David, Saúl, Iván y Carlos) y a Ana, compañera de fatigas inacabables. No os cambiaría por nada.

Gracias a mis primos, a mi padre, a mi madre y a mis hermanos. Ellos han sido los protagonistas principales de mis desahogos, dilemas, dudas y alegrías. Siempre con sinceras y sabias palabras. Os quiero.

Y a Marta. Mi persona favorita en todo el mundo. Espero poder corresponder todo el apoyo que me has dado siempre. Y espero poder hacerlo durante mucho, mucho, mucho tiempo.

Gracias también a aquellos que, sin estar de manera tan presente, han sido de gran ayuda en un momento u otro de este proceso: Manolo Cros, Juan Pablo Aracil, y la Fundación Balaguer.

Por último, mi agradecimiento al Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED) y al proyecto PharmaCog, financiado dentro del marco del séptimo programa de la Comunidad Europea *Innovative Medicine Initiative (IMI)* (FP7/2007-2013), por la financiación que ha hecho posible el desarrollo de los experimentos realizados en esta tesis.

Tabla de contenido

I. INTRODUCCIÓN

1. EL CEREBRO ENVEJECIENDO	13
1.1. Definir el envejecimiento	13
1.2. Envejecimiento cerebral fisiológico y envejecimiento cerebral patológico	14
1.3. Rutas intactas en el cerebro envejecido	17
2. PATOLOGÍAS ASOCIADAS AL ENVEJECIMIENTO: DETERIORO COGNITIVO LEVE Y ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	20
2.1. Hipótesis de la cascada amiloidea	22
2.2. La formación de ovillos promueve la disfunción neuronal.....	26
Ovillos causantes del deterioro en memoria y la demencia.....	28
2.3. Genética de la enfermedad de Alzheimer	29
Apolipoproteína E (APOE).....	30
Presilina 1 y 2 (PSEN1, PSEN2).....	31
GSK-3 β	31
3. DETERIORO COGNITIVO ASOCIADO A LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	34
3.1. Deterioro cognitivo y sistemas de neurotransmisión	34
Glutamato (Glut)	34
Acetilcolina (ACh).....	35
Dopamina (DA).....	37
Serotonina (5-HT)	38
Melatonina.....	39
3.2. Farmacoterapia en la EA	40
Inhibidores de la acetilcolinesterasa	41
Antagonistas de los receptores NMDA.....	41
4. SUEÑO, ESTRÉS, EDAD Y MEMORIA.....	43
4.1. Bases estructurales del ciclo vigilia-sueño.....	43
4.2. Memoria y Aprendizaje	45
Mecanismos moleculares para la formación de recuerdos: el papel del hipocampo y la Potenciación a Largo Plazo.....	48
5. EFECTO DE LA EDAD SOBRE EL SUEÑO Y LA MEMORIA	51
5.1. Memoria y envejecimiento: papel del sistema colinérgico	51
5.2. Sueño y envejecimiento.....	53
5.3. Memoria y estrés	54
5.4. Estrés, sueño y memoria: paradigma de la privación de sueño	55
5.5. Sueño y estrés.....	57

6. OCTODON DEGUS COMO MODELO PARA EL ESTUDIO DE ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS Y DETERIORO COGNITIVO ASOCIADO A LA EDAD.....	58
6.1. Similitudes histopatológicas humano / <i>O. degus</i>	59
6.2. Octodon degus, ¿qué ofrece?	60

II. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. ANIMALES.....	69
2. DISEÑO EXPERIMENTAL	70
2.1. Experimentos conductuales	70
2.2. Extracción de sangre para medición de cortisol.....	71
3. PROCEDIMIENTOS.....	71
3.1. Privación de sueño.....	71
3.2. Radial Arm Maze.....	72
Fase de habituación.....	72
Fase de entrenamiento.....	73
Fase de test.....	74
3.3. Barnes Maze	74
Fase de habituación.....	75
Fase de entrenamiento.....	76
Fase de test.....	77
3.4. Novel Object Recognition.....	78
Fase de familiarización	78
Reconocimiento de lugar (Novel Local Recognition; NLR)	78
Reconocimiento de objeto (Novel Object Recognition; NOR)	78
3.5. HPLC.....	79
Sacrificio de los animales y obtención de las muestras	79
Tratamiento de las muestras.....	80
Soluciones y reactivos	80
Procedimiento de derivatización.....	81
Sistema de Cromatografía.....	81
3.6. ELISA	82
Obtención y tratamiento de las muestras	82
Curva patrón.....	83
Ensayo ELISA.....	83
4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	84

IV. RESULTADOS

1. EFECTO DE LA PRIVACIÓN DE SUEÑO EN EL <i>O. DEGUS</i>	89
1.1. Efecto de la privación de sueño sobre la memoria y el aprendizaje espacial en <i>O. degus</i> joven medido con el paradigma de Radial Arm Maze	89
1.2. Efecto de la privación de sueño sobre la memoria y el aprendizaje espacial en <i>O. degus</i> joven medido con el paradigma de Barnes Maze	91
1.3. Efecto de la privación de sueño sobre la memoria y el aprendizaje espacial en <i>O. degus</i> joven medido con el paradigma de Novel Object Recognition	94
1.4. Efecto de la privación de sueño sobre la memoria y el aprendizaje espacial en <i>O. degus</i> añosas medido con el paradigma de Radial Arm Maze	96
1.5. Efecto de la privación de sueño sobre la memoria y el aprendizaje espacial en <i>O. degus</i> viejo medido con el paradigma de Barnes Maze.....	99
1.6. Efecto de la privación de sueño sobre la memoria y el aprendizaje espacial en <i>O. degus</i> viejo medido con el paradigma de Novel Object Recognition	102
2. EFECTO DE LA EDAD Y LA PRIVACIÓN DE SUEÑO EN LA MEMORIA Y EL APRENDIZAJE DEL <i>O. DEGUS</i>	103
2.1. Efecto sumatorio de la edad y la privación de sueño medido con el paradigma de Radial Arm Maze	103
2.2. Efecto sumatorio de la edad y la privación de sueño medido con el paradigma de Barnes Maze	105
2.3. Efecto sumatorio de la edad y la privación de sueño medido con el paradigma de Novel Object Recognition	107
3. EFECTO DE MEMANTINA SOBRE LA EDAD Y EL DETERIORO DE MEMORIA INDUCIDO POR PRIVACIÓN DE SUEÑO	109
3.1. Efecto de memantina sobre la edad y el deterioro de memoria inducido por privación de sueño evaluado mediante Radial Arm Maze	109
3.2. Efecto de memantina sobre la edad y el deterioro de memoria inducido por privación de sueño evaluado mediante Barnes Maze.....	111
3.3. Efecto de memantina sobre la edad y el deterioro de memoria inducido por privación de sueño evaluado mediante Novel Object Recognition	113
4. MEDICIÓN DE LOS NIVELES DE CORTICOSTERONA EN <i>O. DEGUS</i> DE DISTINTAS EDADES BAJO CONDICIONES DE SUEÑO NORMAL Y PRIVACIÓN DE SUEÑO.....	115
5. EFECTO DE LA EDAD SOBRE LOS NIVELES DE NEUROTRANSMISORES IMPLICADOS EN PROCESOS DE APRENDIZAJE Y MEMORIA EN EL <i>O. DEGUS</i>	116
5.1. Niveles de glutamato, acetilcolina, dopamina, serotonina y melatonina en la corteza frontal de <i>O. degus</i> de diferentes edades (6, 12 y 36 meses).....	116
5.2. Niveles de glutamato, acetilcolina, dopamina, serotonina y melatonina en el hipocampo de <i>O. degus</i> de diferentes edades (6, 12 y 36 meses).....	119
5.3. Niveles de glutamato, acetilcolina, dopamina, serotonina y melatonina en el epítalamo de <i>O. degus</i> de diferentes edades (6, 12 y 36 meses)	121
6. RESUMEN DE RESULTADOS	124
6.1. Resultados experimentos conductuales	124
Radial Arm Maze y Barnes Maze.....	124

Novel Object Recognition.....	124
6.2. Resultados HPLC.....	125

V. DISCUSIÓN

1. DISCUSIÓN DEL MÉTODO	129
1.1. Características de los animales	129
1.2. Tipos de test.....	130
1.3. Privación de sueño.....	132
2. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS.....	134
2.1. Efecto de la edad y la privación de sueño en la memoria	134
2.2. Discusión de los resultados obtenidos por HPLC	138
Glutamato.....	138
Acetilcolina.....	140
Dopamina.....	141
Serotonina	144
Melatonina.....	145
2.3. Efecto de memantina sobre la edad y la privación de sueño.....	146
2.4. Efecto de la edad, el estrés y la privación de sueño	149
2.5. Edad, sueño, neurotransmisores y estrés: una propuesta integradora.....	153
¿Cómo relacionar los resultados con el sueño y la memoria?.....	157
3. PERSPECTIVAS FUTURAS	159

VI. CONCLUSIONES

VII. BIBLIOGRAFÍA

INTRODUCCIÓN

1. El cerebro envejeciendo

1.1. Definir el envejecimiento

Existen múltiples factores a tener en cuenta a la hora de definir el envejecimiento. De forma general, se define el envejecimiento como el conjunto de modificaciones morfológicas y fisiológicas que aparecen en el organismo como consecuencia de la acción del tiempo. Existen varios parámetros mediante los que se puede medir el envejecimiento, siendo la edad el preferido en la mayoría de casos. No obstante, la edad se puede aplicar a diferentes tipos de envejecimiento, lo que vuelve la medida un tanto ambigua sin un contexto más específico. Por ejemplo, existe un envejecimiento probabilístico (Grafenhofer y cols., 2006) que hace referencia a aquellos cambios que la edad puede provocar en unos sujetos y no en otros, en un sentido más sociodemográfico que biológico. Para evitar confusiones de este tipo, en este trabajo «envejecimiento» se refiere al envejecimiento cronológico, siendo la edad en años, meses o semanas a partir del nacimiento, las unidades elegidas como marco de referencia.

La Organización Mundial de la Salud define la esperanza de vida como *«el número medio de años que una persona puede prever que vivirá [...] teniendo en cuenta las tasas de mortalidad y la distribución de la prevalencia de los problemas de salud en la población en ese momento»*. En los humanos, la esperanza de vida varía en función de la distribución demográfica: en el caso de sociedades industrializadas, la esperanza de vida media se sitúa en los 82 años en países como España y Australia, y 79 años en otros como EE.UU. y Dinamarca (Datos de la OMS correspondientes al año 2009), en contraposición de otros como India (65 años) o Afganistán (48 años). Las medidas de mortalidad, como la esperanza de vida y las tasas de mortalidad, entre muchas otras, se han utilizado extensamente como indicadores de salud de las poblaciones. Sin embargo, una baja mortalidad o la mera supervivencia no son forzosamente sinónimos de buena salud, y los índices de mortalidad al uso pierden sensibilidad para reflejar

las condiciones sanitarias a medida que las poblaciones envejecen y aumentan su longevidad de acuerdo con el proceso de transición demográfica (OMS, 1984), de modo que surgen otros parámetros. Ya en 1971 Omran, describió de una manera genérica el paso desde una preponderancia de las defunciones por enfermedades infecciosas hacia un escenario con mayor peso relativo de las causas crónicas y degenerativas de muerte, que además van concentrándose en edades progresivamente más avanzadas (Omran, 1971).

Con estas consideraciones, podríamos realizar un primer intento de definir el envejecimiento como un proceso multidimensional e irreversible que recoge los cambios acumulados ocurridos en un organismo con el paso del tiempo, desde el momento de su nacimiento. Dentro de todas las variables fisiológicas y conductuales que se ven afectadas por este fenómeno, el debate aquí se centra principalmente en el envejecimiento cerebral y sus consecuencias sobre la conducta. Según la Asociación Norteamericana de Enfermería Diagnóstica (NANDA, por sus siglas en inglés), el envejecimiento se podría definir como «*el deterioro funcional progresivo de naturaleza física y cognitiva*» (NANDA, 2011).

1.2. Envejecimiento cerebral fisiológico y envejecimiento cerebral patológico

En los últimos años ha habido grandes avances en la conceptualización de la demencia y el deterioro cognitivo que ocurren en la vejez. En particular, este último podría entenderse como un *continuum*, con una distinción entre demencia y diferentes grados de gravedad en el déficit cognitivo. Una variedad de términos y etiquetas diagnósticas se utilizan para describir múltiples estados a lo largo del espectro del deterioro cognitivo en la vejez, entre los que se incluyen la demencia, el deterioro cognitivo leve (DCL) y el declive cognitivo asociado con la edad (Burns y Zaudig, 2002). Los límites entre estos diferentes estados no están claros totalmente, y varían dependiendo de las definiciones particulares que se aplican (Yankner, 2008). De manera generalizada, el envejecimiento implica una pérdida de ciertas funciones cognitivas, como mera consecuencia del proceso normal del paso de los años (Ritchie y cols.,

1996; Laursen, 1997). La dificultad estriba en delimitar en qué medida ese deterioro cognitivo es debido a un proceso normal o a un proceso patológico.

Como proceso resultante del paso del tiempo, el envejecimiento no está exento de vulnerabilidades. Y los motivos y matices por los cuales puede verse comprometido son muchos, siendo diferentes las consecuencias y circunstancias de cada uno. Por este motivo, a la hora de tratar las patologías del sistema nervioso central (SNC) asociadas al envejecimiento es fundamental distinguir entre unas y otras. Como se ha mencionado, el envejecimiento normal implica una pérdida gradual, más o menos significativa (según individuos) de habilidades cognitivas como la memoria, la velocidad en el procesamiento de la información o las habilidades visuoespaciales (Bartrés-Faz y cols., 1999). Sin embargo, debido a las complicaciones, dificultades y malestar que puede generar, entre todos estos cambios, el más llamativo es el deterioro en la memoria. Los problemas en la memoria a edad avanzada no sólo resultan molestos por los inconvenientes que causan en sí mismos, sino que por lo general disparan cierto grado de alarma, debido al conocimiento popular de que puede ser un síntoma de demencia (Bishop y cols., 2010; Albert, 2011).

El envejecimiento en los humanos viene acompañado de cambios cerebrales a nivel estructural y neurofisiológico, así como junto a grados variables de déficit cognitivo (Bishop y cols., 2010). Estudios de neuroimagen funcional han sido capaces de aportar datos significativos para la comprensión de este decaimiento en la actividad, y cómo se producen estos cambios (Rodríguez y Raz, 2004; Bishop y cols., 2010). En concreto, lo que estos estudios parecen indicar es que regiones separadas del cerebro que interactúan para sobrellevar funciones cognitivas superiores se comportan de manera más descoordinada con la edad, lo que sugiere una pérdida de la función cerebral de las personas de mayor edad (Andrews-Hanna y cols., 2007). Resulta importante señalar que esta reducción en la coordinación de la actividad cerebral está asociada a una ejecución pobre en varios dominios cognitivos (Andrews-Hanna y cols., 2007). Y que

además de estar menos integrada, la actividad neuronal se vuelve menos localizada en algunas regiones cerebrales (especialmente en la corteza prefrontal) como respuesta a tareas de control ejecutivo (Cabeza, 2002; Park y Reuter-Lorenz, 2009). Por el contrario, las personas jóvenes (adultas) activan regiones más concretas de este área prefrontal del cerebro para llevar a cabo las mismas tareas, integrándolas con otras más cercanas, como la corteza somatosensorial o el área ventromedial (Park y Reuter-Lorenz, 2009). Las personas de edad que muestran actividad dispersa despliegan un mejor grado de ejecución que personas de su misma edad con una actividad más localizada, apoyando la idea de que la dispersión de la actividad podría estar funcionando a modo de mecanismo de compensación (Cabeza, 2002; Cabeza y cols., 2002). Estos resultados sugieren que la biología cerebral de los sistemas de orden superior se ve alterada de manera significativa en un proceso de envejecimiento normal, sin la aparición de ninguna enfermedad. Se ha sugerido que este deterioro podría deberse a la disrupción de las fibras mielinizadas que conectan las distintas regiones corticales (Andrews-Hanna y cols., 2007). Así, aunque la pérdida neuronal es mínima en la mayoría de áreas de la corteza en el envejecimiento normal (Yankner y cols., 2008), se ha demostrado que los cambios en la fisiología de las sinapsis de las neuronas envejecidas pueden contribuir a la alteración de la conectividad y la integración de la información (Bishop y cols., 2010). Es más, varios estudios genéticos realizados en humanos y animales muestran cambios significativos en la expresión de varios genes vinculados a las sinapsis (Lu y cols., 2004; Fraser y cols., 2005; Loerch y cols., 2008). Por ejemplo, se ha demostrado que en la corteza prefrontal tanto de humanos como de primates no humanos, los genes implicados en la neurotransmisión inhibitoria mediada por GABA aparecen con una marcada regulación a la baja en función de la edad (Loerch y cols., 2008), lo que sugiere un posible aumento del desequilibrio excitatorio-inhibitorio en la neurotransmisión (Loerch y cols., 2008). Este cambio podría predisponer al individuo a

procesos de excitotoxicidad, y una patología neurodegenerativa podría explicar la alta actividad neuronal en la corteza prefrontal que se ve en las personas de edad avanzada (Fakhri, 2012).

Una cuestión central es de qué manera estos cambios funcionales, que aparecen en la mayoría de individuos según se hacen mayores, están claramente diferenciados de procesos patológicos asociados con trastornos neurodegenerativos, como la enfermedad de Alzheimer (EA). Por un lado, el envejecimiento normal está asociado con una disminución de la actividad metabólica en el subículo y en el giro dentado, mientras que esta misma disminución encontrada en la corteza entorrinal parece que podría ser un indicador temprano de EA (Small y cols., 2002). Estudios con resonancia magnética por imagen funcional (fMRI) sugieren que una disminución en la actividad del hipocampo y áreas corticales asociadas pueden servir como marcadores de envejecimiento patológico (Yankner y cols., 2008). Por otro, a nivel histopatológico, la pérdida neuronal, que comienza en la corteza entorrinal y en la región CA1 del hipocampo, junto con la pérdida de volumen en el lóbulo temporal medial, puede ser un distintivo del Alzheimer asociado con el envejecimiento (Price y cols., 2001; Rodrigue y Raz, 2004). Sin embargo, marcadores patológicos de la EA que pueden relacionarse con el déficit cognitivo, como la reducción de las sinapsis o el aumento de las placas seniles, también pueden hallarse en sujetos mayores que no presentan alteración en sus funciones. Por este motivo, para entender las diferencias entre la EA y el envejecimiento cerebral normal, es necesario un conocimiento mayor de los mecanismos de acción subyacentes al proceso de envejecimiento.

1.3. Rutas intactas en el cerebro envejecido

Estudios de genética durante el envejecimiento de distintas especies han descubierto algunas categorías funcionales conservadas en genes con cambios en su expresión dependientes de la edad (Price y cols., 2001; Yankner y cols., 2008). Particularmente, muchos de estos estudios aportan pruebas de reducción de la función mitocondrial durante el envejecimiento. Es más, la menor expresión de genes implicados en el metabolismo energético

mitocondrial podría ser más significativa en personas con deterioro cognitivo y EA (Blalock y cols., 2004; Liang y cols., 2008; Miller y cols., 2008). A pesar de las claras evidencias de conservación de algunas rutas y huellas en la expresión génica, un estudio que comparaba directamente la expresión génica durante el envejecimiento en cerebros de ratón, *Macaca rhesus* y de humanos, señalaba importantes divergencias evolutivas (Loerch y cols., 2008). Aunque en las tres especies se encontraron más de 150 genes susceptibles de cambios en su expresión debidos a la edad, no todos cambiaban su expresión en el mismo sentido. Una parte significativa de los 150, principalmente con papeles en la función neuronal, se vieron regulados a la alta en ratones, pero regulados a la baja en humanos. Esta diferencia sugiere un cambio evolutivo hacia la represión de varios genes asociados a la función neuronal durante el envejecimiento. Además, estudios bioquímicos y estereológicos de conteo neuronal en corteza de humanos mayores sugieren que no es probable una pérdida neuronal (Yankner y cols., 2008; Loerch y cols., 2008). Dado que en comparación con otras especies de mamíferos, varios trastornos neurodegenerativos (entre ellos la EA) parecen manifestarse de forma preferente en los humanos, es necesario tener en cuenta la posible contribución de la evolución en los cambios en la expresión génica.

Los datos epidemiológicos indican que la EA es la causa más frecuente de demencia en la vejez (Fig. 1). Sin embargo, se ha observado que marcadores de la patología de Alzheimer pueden estar presentes en una proporción importante aún en personas sin estados de demencia, y que la presencia de placas acumuladas de proteína β -amiloide (β A) y de ovillos neurofibrilares de proteína tau hiperfosforilada (NFTs, por sus siglas en inglés), no es factor suficiente para provocar este estado (Stott, 2006).

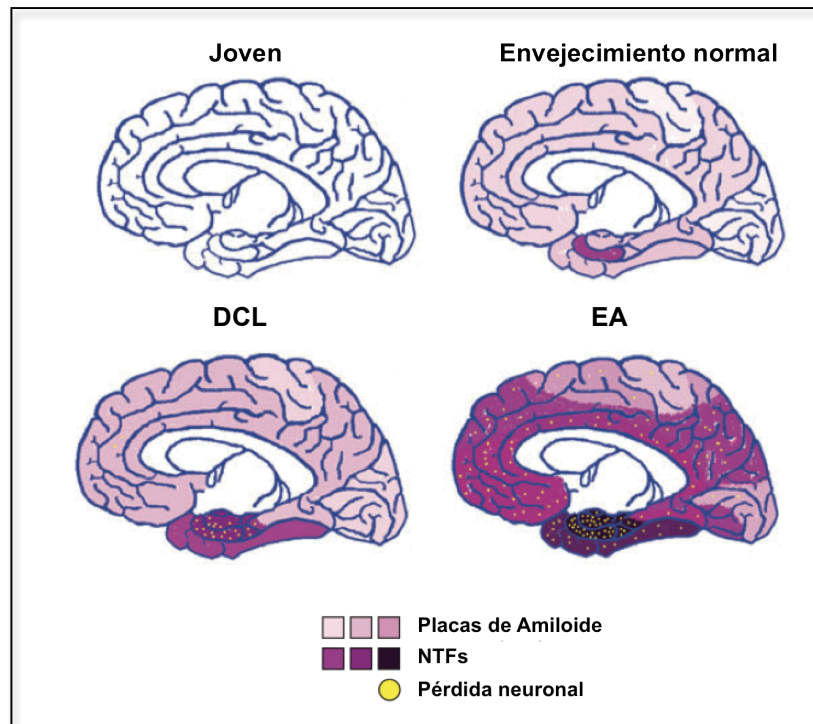


Fig. 1. Progresión de la neuropatología en el envejecimiento y la EA. La figura muestra la distribución neuroanatómica de las placas de βA , los NFTs y la pérdida neuronal durante el envejecimiento normal, el DCL y la EA. En sujetos cognitivamente intactos, las placas pueden aparecer en las zonas del córtex prefrontal y el hipocampo, mientras que los NFTs se localizan principalmente en la corteza entorrinal. El DCL se caracteriza por la pérdida neuronal en la segunda capa de la corteza entorrinal y la región CA1, y está frecuentemente acompañado por un incremento en la distribución de placas y NFTs. Ambas, tanto las placas como los NFTs están ampliamente distribuidos en la EA, aunque de forma más variable. Sin embargo, la extensión de la pérdida neuronal y de las sinapsis correlaciona con el grado de demencia. *(Adaptado de Yankner y cols., 2008)*

2. Patologías asociadas al envejecimiento: deterioro cognitivo leve y enfermedad de Alzheimer

En el envejecimiento normal, la pérdida progresiva de ciertas funciones cognitivas es un fenómeno común. En este sentido, parece claro que el envejecimiento es el primer factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas. Sin embargo, no todas las enfermedades neurodegenerativas presentan el mismo grado de prevalencia ni gravedad. De entre ellas, la EA es la más extendida, y sus consecuencias resultan muy incapacitantes, pero existen otras alteraciones neurodegenerativas que comparten ciertos síntomas con ella, como el DCL. A pesar de poseer una etiopatogenia y mecanismo subyacente diferente de la EA, el DCL puede aparecer también como un periodo pre-demencia (Schliebs y Arendt, 2011), aunque no necesariamente.

La EA es un trastorno neurodegenerativo que se caracteriza por una pérdida progresiva e incapacitante de funciones cognitivas, conductuales y sociales (Sadowsky y Galvin, 2012), siendo la memoria la primera y más afectada de estas cualidades. Al no conocerse las causas de esta enfermedad, la EA no tiene cura, aunque sí es posible mejorar la capacidad cognitiva de los pacientes y frenar el progreso de la enfermedad (Dominguez y cols., 2011). Sin embargo, como en la mayoría de las patologías, el diagnóstico precoz es uno de los factores clave para poder aplicar estas estrategias (Ballard y cols., 2011a). Desafortunadamente, el diagnóstico precoz es, a su vez, una de las dificultades más limitantes de la EA, debido principalmente a que todavía existen pocas pruebas diagnósticas precisas: la más eficaz es mediante un examen *post mortem*; otra es a partir de la manifestación de los primeros síntomas, representados en la mayoría de casos por evidencias de deterioro cognitivo, lo cual resulta en muchos casos un punto de no retorno para el tratamiento (Waldemar y cols., 2007; Ballard y cols., 2011a).

La EA progresa de forma insidiosa hasta que los síntomas se manifiestan y la memoria y otros dominios cognitivos como la orientación, resolución de problemas o incluso cambios en la personalidad, se hacen evidentes. En muchos casos, cuando el deterioro evoluciona los pacientes no son capaces siquiera de cuidar de sí mismos y requieren de otras personas para recibir cuidados continuos (Haak y Peters, 2004). Aún así, existe una serie de alternativas farmacológicas y psicológicas que aplicadas en diferentes etapas del proceso, tienen como objetivo anticiparse a la pérdida funcional. No obstante, estas alternativas se centran en la sintomatología, por lo que se vuelve necesario un entendimiento mayor sobre la causa de esta enfermedad y su progresión natural si se quiere entender cuándo y cómo tratarla de la manera más efectiva posible.

Existen varios enfoques para el estudio de la EA, incluidos los basados en modelos celulares (Moghekar y cols., 2011; Leuner y cols., 2012). Sin embargo, a pesar de que estos modelos pueden ser muy útiles para los mecanismos moleculares que subyacen a la sintomatología, hay una gran brecha entre las conclusiones deducidas de ellos y las manifestaciones clínicas de la enfermedad. Por otro lado, el uso de especies animales puede contribuir no sólo a la comprensión de las características celulares y fisiopatológicas de la EA, sino servir también para reproducir ciertos déficits cognitivos observados en los pacientes. Ciertamente, esto resulta un enfoque más ecológico y adecuado; más acertado para la apreciación de las diferentes características del trastorno. En este sentido, se podría decir que un modelo animal es tan bueno como su capacidad para imitar tanto las condiciones fisiopatológicas como la evolución de los síntomas conductuales (en caso de existir) de determinada alteración. Por lo tanto, es fundamental que tales modelos sean capaces de medir la función cognitiva y comportamental de una manera precisa y fiable. En el intento de reproducir la patología de Alzheimer, se han generado gran número de estos modelos animales, siendo los roedores la especie preferida para este fin (Hock y Lamb, 2001; Spires y Hyman, 2005), logrando

algunos avances prometedores (Muhammad y cols., 2008; Small y Duff, 2008). Desafortunadamente, tal y como múltiples estudios demuestran, los marcadores patológicos típicos de la EA están ausentes de forma natural en roedores, lo que hace necesario la producción de animales transgénicos que sobre expresen la proteína humana precursora de amiloide (APP) (Oddo y cols., 2003), o realizar inyecciones intracerebrales de agregados de β A (Rosen y cols., 2012) para lograr estados homólogos de la enfermedad. Así, en las últimas décadas, el número de modelos transgénicos que se han desarrollado ha aumentado notablemente, ampliando las alternativas y apuntando a las características que más significativamente se identifican dentro de los trastornos neurodegenerativos asociados a la edad (German y Eisch, 2004; Gotz y cols., 2004). Si bien estos modelos también presentan diversas dificultades que limitan su valor translacional, como es la necesidad de utilizar modelos que requieren la manipulación externa, lo cual resulta un inconveniente desde el punto de vista ecológico.

2.1. Hipótesis de la cascada amiloidea

En el campo de la neurociencia, el estudio de los trastornos neurodegenerativos es una de las principales áreas de interés, siendo el desarrollo de terapias y estrategias de intervención uno de los focos de atención primarios relacionados con el tema. Sin embargo, para lograr este objetivo es esencial comprender el origen de su etiología y su etiopatogenia, así como su progreso a través de diferentes mecanismos celulares, y cómo estos afectan los procesos cognitivo-conductuales.

La hipótesis de la cascada del péptido β A es desde hace más de dos décadas una de las fuentes más fructíferas para el desarrollo de hipótesis acerca de la etiopatogenia de la EA. De acuerdo con esta hipótesis, el aumento de proteína β A es el disparador para la aparición del resto de las características patológicas de la enfermedad, incluyendo la hiperfosforilación de tau, la formación de NFTs, la disfunción sináptica y la muerte neuronal (Ballard y cols., 2011a).

Según esta propuesta, la acumulación de β A es el desencadenante patológico inicial de la enfermedad. Esta acumulación, provocará la formación de las placas seniles, la muerte neuronal y, finalmente, la demencia que acompaña a la EA. No obstante, no es extraño encontrar acumulación de placas que contienen fragmentos de β A en la corteza cerebral de sujetos mayores sanos (Ferrer, 2012). En este sentido, el hecho de que existan placas en ausencia de síntomas cognitivos es un punto a favor de la idea de que a pesar de que sí contribuye claramente a los mecanismos subyacentes de la patología, la acumulación amiloide es sólo un factor de entre tantos otros situados en la base del trastorno (Ferrer, 2012; Nelson y cols., 2012).

La APP pertenece a un subtipo de glicoproteínas transmembrana que se expresan por todo el sistema nervioso, en diferentes tipos de células. La fracción N-terminal de la APP puede bien proyectarse hacia el dominio extracelular, bien localizarse en el lumen de las vesículas intracelulares, como las que se encuentran en el retículo endoplásmico o el aparato de Golgi (Neve y McPhie, 2000; Liao y cols., 2012). Por otra parte, la región C-terminal se sitúa en el citoplasma (Eisenberg y Jucker, 2012). La APP es sensible a la proteólisis de las α -, β - y γ -secretasas, responsables de la producción del péptido β A (1—40) y la variante β A (1—42), que posee una capacidad mucho mayor para autoagregarse (Sinha y cols., 2012). En un escenario neuronal normal, estas secretasas liberan fragmentos tanto de β A como de APP sobrante, que se convierte en la fracción extracelular de APP (Fig. 2). Se ha sugerido que la APP posee una capacidad trófica neuronal (Neve y McPhie, 2000), así como de neuroprotección, tráfico de las vesículas en los axones y adhesión celular (Zhang y cols., 2011). Sin embargo, el papel funcional de la APP es todavía desconocido en gran parte.

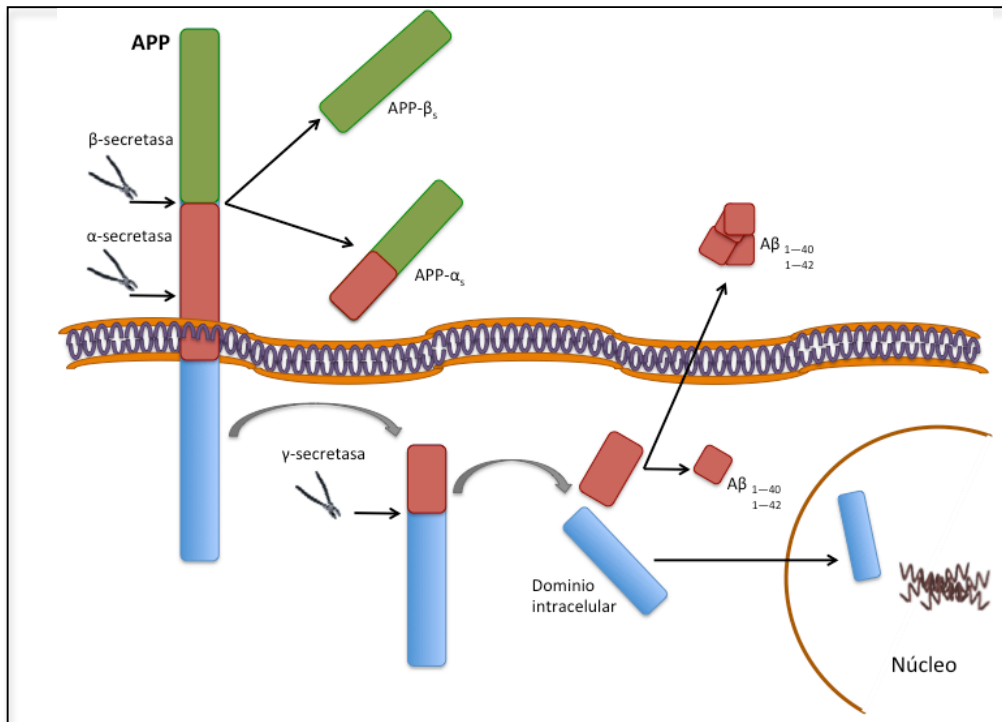


Fig. 2. Fragmentación de la APP. Dos enzimas se encargan de dividir la APP en su sección extracelular: la β -secretasa (o BACE) y α -secretasa. Dentro de la célula, la γ -secretasa fracciona la sección restante, separando el dominio intracelular y la porción β de la proteína. Mientras que el dominio intracelular se traslada al núcleo, un exceso de procesamiento de la porción β puede dar lugar a las variantes 1–40 y 1–42, relacionadas con la patología de Alzheimer y presentes tanto intracelular como extracelularmente.

En lo concerniente a su genética, la APP presenta una compleja variabilidad en el *splicing* alternativo de sus exones (Selkoe, 2001b). El gen de la APP está localizado en el cromosoma 21, y mutaciones patológicas en la secuencia que codifica para βA en este gen puede provocar una superproducción de βA , o un aumento en su capacidad de autoagregado, lo que genera la acumulación de placas (Seubert y cols., 1993). Distintos trabajos de laboratorio han observado que la eliminación del gen de la APP en ratones mutantes no parece afectar significativamente la esperanza de vida de estos animales. Por otro lado, sí que se ha descrito algún cambio menor en la conducta locomotora y la gliosis de ratones adultos (Zheng y cols., 1995). La βA es principalmente secretada por las neuronas y se puede encontrar también en el fluido cerebroespinal y en sangre, debido a que se ha demostrado que se puede acumular igualmente en capilares, arteriolas y vénulas (Haass y cols., 1992; Seubert y cols., 1992).

Resulta interesante saber que la variante βA (1—42) se acumula en áreas específicas del cerebro, como el cerebelo, el estriado y el tálamo (Cummings y cols., 1996; Selkoe, 2001a). Otro factor genético asociado a la EA es el gen que codifica para el receptor de sortilina (SORT1) (Meng y cols., 2007; Rogaeva y cols., 2007; Lee y cols., 2008; Reitz y cols., 2011a). La SORT1 está implicada en el transporte de la APP desde la superficie al interior de la célula y en el procesamiento de la γ -secretasa de esta proteína (Rogaeva y cols., 2007; Lane y cols., 2010; Reitz y cols., 2011b), lo que la encaja dentro de la hipótesis de la cascada amiloidea.

Sin embargo, a pesar del apoyo mayoritario de la comunidad científica, la hipótesis de la cascada amiloidea deja abiertos varios interrogantes que pueden poner en entredicho la consistencia de sus postulados. Existen dos objeciones principales a la hipótesis de la cascada amiloidea. Una, tanto las placas seniles como los NFTs bien podrían ser un producto de la neurodegeneración que ocurre en la EA, más que ser su origen. Segundo, no está del todo claro cómo estos ovillos inician la agregación de los depósitos de βA , o si estos depósitos actúan como el disparador inicial de la causa inicial de la aparición de los ovillos (Reitz, 2012). Estas objeciones surgen de la observación de distintos trabajos con resultados contradictorios a los postulados de esta hipótesis. Por ejemplo, se sabe que en personas que han sufrido un trauma en la cabeza, la APP se encuentra con particularidades patológicas similares a los enfermos de Alzheimer en el soma de las neuronas, así como neuritas distróficas alrededor de depósitos de βA (Gentleman y cols., 1993). Además, hay datos que confirman que las neuronas del lóbulo temporal medial secretan APP y muestran inmunoreactividad aumentada para esta proteína (McKenzie y cols., 1994). Estos resultados sugieren que el aumento de expresión en la APP tras sufrir un trauma craneal puede corresponderse con una fase de respuesta aguda de lesión neuronal (Roberts y cols., 1994), lo que puede conllevar un aumento de los depósitos de βA . Esta idea está apoyada por las observaciones de diferentes estructuras morfológicas que presentan estas acumulaciones (Kalaria y Perry, 1993). Coherente con estos resultados, se ha

propuesto que en la EA, la APP resulta, de hecho, una reacción al proceso patológico que se produce como un intento de mantener la homeostasis celular (Regland, 1992). La potencial acción neurotrófica de la APP se fundamenta en la observación de que comparte elementos estructurales con el precursor del factor de crecimiento epidermal (Regland, 1992). A estas aportaciones se suman los descubrimientos surgidos de los estudios con animales, los cuales sugieren que la formación tanto de las placas de β A como de los ovillos puede ser inducida y no basal. Experimentos llevados a cabo en ratas demuestran una elevación de la APP en la corteza tras lesiones en el núcleo basal de Meynert (Wallace y cols., 1991), y que inyecciones de toxinas, tanto intratectales como intraparenquimales, favorecen la expresión de APP en neuronas del hipocampo (Yan y cols., 1999).

2.2. La formación de ovillos promueve la disfunción neuronal

Las placas seniles y los NFTs se aglomeran en proporciones significativas en las áreas corticales, pero parecen estar distribuidas independientemente las unas de las otras (Armstrong, 2006). Asimismo, ambas formaciones parecen ocurrir en momentos diferentes, en tanto que hay evidencia que demuestra que la formación de NFTs en la corteza entorrinal tiene lugar en un momento previo a la aparición de las placas (Duyckaerts, 2004), hecho que podría indicar que ambos fenómenos están patogénicamente desconectados. Aún así, existen varios datos provenientes de estudios con animales transgénicos que parecen mostrar un efecto de la proteína β A en la formación de los ovillos (Reitz, 2012). Estos hallazgos son consistentes con estudios que indican que las neuronas hipocampales de fetos de rata y neuronas corticales humanas tratadas con fibrillas de β A presentan un nivel aumentado de tau fosforilada (Busciglio y cols., 1995), lo que aporta más pruebas de que la formación de fibras de amiloide pueden alterar el grado de fosforilación de tau, lo que conduce a la pérdida de la capacidad de unión de los microtúbulos (Fig. 3). Otros estudios demuestran que la proteína β A 25–35 es capaz de inducir la acumulación de proteína tau y que péptidos de esta proteína pueden provocar una

reducción de la acumulación de β A (Perez y cols., 2004). Siendo así, la acumulación de tau podría estar asociada al desmembramiento de β A, lo que explicaría la falta de correlación espacial de las placas seniles y los ovillos. Finalmente, la idea de una influencia de la β A sobre la formación de NFTs está apoyada por estudios en ratones transgénicos que carecen de APP. Estos estudios informan de que existe una reducción en los niveles endógenos de tau que puede mejorar algunos de los déficits conductuales y otros problemas mediados por β A (Roberson y cols., 2007, 2011). Otro resultado a favor de esta idea es el descubrimiento de que mutaciones en el gen de tau causan demencia frontotemporal autosómica dominante con una patología de tau similar a la descrita en la EA, aunque sin aparición de placas β A (Hutton y cols., 1998). Ambas observaciones parecen situar a la patología de tau en la cascada de la patología de la β A.

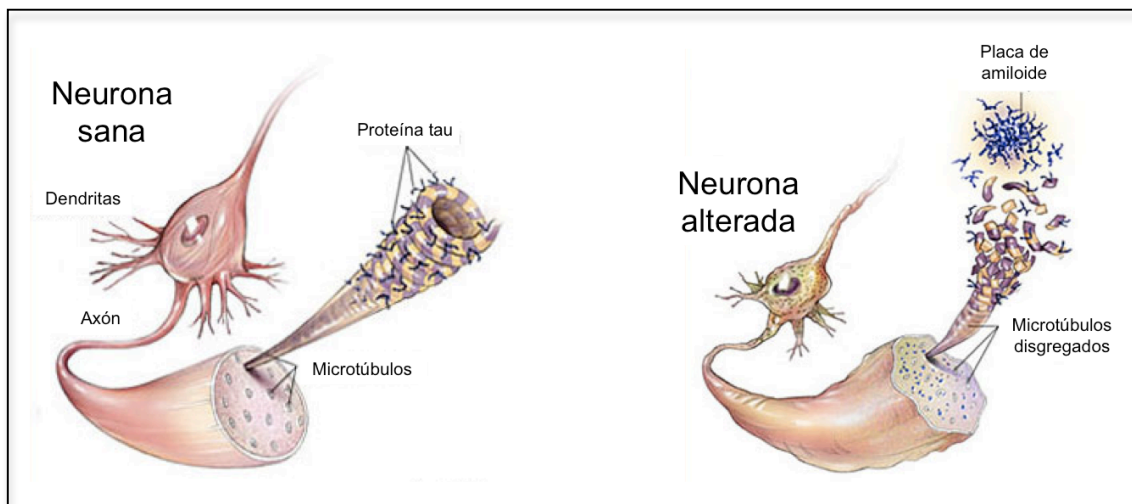


Fig. 3. Anatomía de una neurona sana y una neurona con patología de Alzheimer. En la neurona sana, la proteína tau funciona correctamente para la formación de los microtúbulos. En la neurona alterada, en cambio, las placas de proteína β A precipita la hiperfosforilación de la proteína tau, que lleva a la malformación de los ovillos y posterior aparición de los NFTs. (Imagen de Bob Morreale, facilitada por la Fundación Americana para la Asistencia Sanitaria).

Adicionalmente, otro conjunto de estudios demuestran que ratones que sobrepresen una variante mutada de tau (P301L) muestran NFTs asociados a la edad, muerte neuronal y problemas de memoria (Ramsden y cols., 2005; Santacruz y cols., 2005). Aunque la inhibición de la sobrepresión de esta variante bloquea la muerte neuronal y mejora la memoria, los ovillos

siguen formándose (Spires y cols., 2006). Esto sugiere que los ovillos por sí mismos no resultan tóxicos, sino que son los procesos tras su formación y tras la muerte y disfunción neuronal los que subyacen al mecanismo patológico. Se distinguen tres fases en la formación de fibrillas de tau (Maeda y cols., 2007; Kimura y cols., 2008; Takashima, 2008).

- 1) En un primer momento, los monómeros hiperfosforilados de tau se unen para formar oligómeros.
- 2) Segundo, los oligómeros solubles adquieren una estructura de hoja β plegada, formando los agregados insolubles. Estos agregados se reestructuran en oligómeros con forma granulada.
- 3) Por último, el incremento en la concentración de tau granulada provoca la fusión de estos oligómeros, formando así los ovillos (Maeda y cols., 2007).

Ovillos causantes del deterioro en memoria y la demencia

A diferencia de la acumulación de βA , el número de NFTs sí se correlaciona significativamente con el grado de demencia (Nelson et al., 2012). En cerebros enfermos, la pérdida de neuronas y sinapsis es notable en zonas donde se detectan estas formaciones de tau, lo que apunta a una asociación entre los ovillos que aparecen en la EA y el deterioro en la memoria y en la demencia (Masliah y cols., 1992). Además, se ha observado que el primer lugar en el que tienden a aparecer estos ovillos es la corteza entorrinal, una región clave para la formación y mantenimiento de la memoria, extendiéndose posteriormente hacia la corteza límbica y prefrontal, así como a regiones asociadas con la emoción y funciones cognitivas superiores (Takashima, 2012). Considerando el papel de estas regiones cerebrales en el funcionamiento normal del cerebro, la formación secuencial de los NFTs podría de algún modo explicar la progresión clínica observada en la EA. Tau hiperfosforilada se ha asociado con la pérdida de sinapsis, mientras que los oligómeros granulares parecen estar implicados en la

muerte neuronal (Kimura y cols., 2007), lo que sugiere que la disfunción neuronal resultante de la pérdida de sinapsis y neuronas se da durante la formación de los NFTs (Kimura y cols., 2010).

2.3. Genética de la enfermedad de Alzheimer

Han transcurrido casi quince años desde el descubrimiento de la primera mutación causante de EA. Este hecho trascendental condujo a construir la hipótesis de la cascada amiloidogénica como acontecimiento clave en la patogenia de este proceso (Hardy y Gwinn-Hardy, 1998). Sin embargo, como se ha presentado en el apartado anterior, la acumulación de placas no es factor suficiente para que las personas lleguen a desarrollar patología neurodegenerativa ni demencia. De hecho, es necesario que entre los elementos disruptivos la persona cuente con un perfil genético que predisponga a la aparición de todos estos componentes. En el contexto de la hipótesis amiloidea, se ha visto que los genes identificados como relevantes en los estadios avanzados de la EA no se heredan siguiendo un patrón mendeliano, sino más bien se transmiten de forma esporádica (Reitz, 2012). Sin embargo, parece cierto que familiares de primer grado de pacientes con EA presentan el doble de riesgo asociado a padecer esta enfermedad, en comparación con pacientes sin familiares cercanos. Asimismo, en estudios con gemelos se ha observado que la frecuencia de la enfermedad es mayor entre los nacidos monocigóticos que entre los dicigóticos, lo que otorga un considerable peso al factor genético en la EA.

Entre un 1% y un 5% de los casos de Alzheimer se corresponden con formas familiares de inicio precoz que se transmiten con un patrón de herencia mendeliana autosómico dominante (Brickell y cols., 2006). Recientemente se ha demostrado que además de una variante del gen de la apolipoproteína E (APOE), este tipo de Alzheimer está relacionado con mutaciones en tres genes: PSEN1, PSEN2 y el de la APP (Bekris y cols., 2010). Hoy se sabe que la actividad de la presilina 1 (codificada por PSEN1) está relacionada con la formación de las placas seniles típicas de la enfermedad de Alzheimer. Las mutaciones en PSEN1 son responsables de la gran

mayoría de los casos de enfermedad de Alzheimer familiar de inicio precoz y son también, por regla general, las que provocan un cuadro más agresivo en cuanto al momento de inicio de los síntomas y a la rapidez de la evolución. La secuenciación del gen PSEN1 es útil para descartar o identificar mutaciones en presilina 1 en adultos, tanto sintomáticos como asintomáticos, con historia de Alzheimer familiar de inicio precoz. También facilita el diagnóstico diferencial con otras causas de demencia, fundamentalmente en casos en que hay una historia familiar de demencia.

Apolipoproteína E (APOE)

El gen de la APOE, que fue identificado como el primer gen susceptible de contribuir a la EA, es el factor genético de mayor riesgo entre la población (Corder y cols., 1993; Slioter y cols., 1998). Este gen presenta tres alelos (APOE2, APOE3 y APOE4) que traducen tres isoformas de la proteína: ApoE- ϵ 3, de función normal, y ApoE- ϵ 2 y ApoE- ϵ 4, disfuncionales. Concretamente, la isoforma ApoE- ϵ 4 es sobre la que mayor evidencia se ha encontrado en su relación con el deterioro cognitivo y la EA (Corder y cols., 1993). La forma en que las diversas variantes de este gen afectan la sintomatología de la EA no está totalmente comprendida, pero existe cierta convicción acerca del papel de esta proteína en la regulación de la β A, según varios estudios llevados a cabo en ratones mutantes deficientes de la proteína APP (PDAPP) (Holtzman y cols., 2000; Kim y cols., 2009). Apoyando esta idea está la evidencia de que una mayor presencia del alelo APOE- ϵ 4 está relacionado con una mayor carga de β A en los cerebros de pacientes con EA avanzada (Hashimoto y cols., 2012). Estos resultados sugieren que la ApoE interactúa con la β A cerebral facilitando su aglomeración en placas. Habiendo señalado lo decisivo de poseer una variante ApoE- ϵ 4 para el desarrollo de los problemas cognitivos asociados a la demencia en EA, cabe destacar también el papel de otros complejos de genes y proteínas que cada vez más parecen estar demostrando jugar un papel relevante en la patogénesis de la EA. Por ejemplo, se sabe que CLU, el gen que codifica para la proteína clusterina, actúa de manera equivalente a

una chaperona, regulando la toxicidad y la transformación de β A en su forma insoluble, y promoviendo así la formación de placas (DeMattos y cols., 2004). Además, se sabe que uno de los genes que codifica para la proteína de membrana dependiente de ATP (transportadores ABC, por sus siglas en inglés), el ABCA7, tiene capacidad de inhibir la secreción de β - β A (Hollingworth y cols., 2011); que CR1, el gen que codifica para el receptor de adherencia inmune, puede contribuir al despiece de la β A (Wyss-Coray y cols., 2002); que la α 2macroglobulina está implicada en la depuración y degradación del péptido β A (Depboylu y cols., 2006); o que genes que codifican proteínas implicadas en la endocitosis son capaces de modificar el grado de toxicidad de la β A en neuronas glutamatérgicas corticales (Treusch y cols., 2011).

Presilina 1 y 2 (PS1, PS2)

Por su acción sobre la γ -secretasa, se han propuesto a las presilinas como reguladoras del procesamiento de la APP. Una mutación en el gen que codifica para estas presilinas 1 y 2 (PSEN1 y PSEN2, respectivamente) podría subyacer a la fragmentación errónea de la APP y la formación de β A (1—42), la variante más agresiva de depósitos (Neve y McPhie, 2000). Es más, se sabe que la PS1 interactúa con la GSK-3 β , una de las proteínas críticas en la fosforilación de tau. Tanto es así que, en algunos casos de EA, la interacción entre GSK-3 β y una variante anómala de PSEN1 puede incrementar la hiperfosforilación de tau en lugares que transforman tau en una proteína sin la capacidad para asociarse al citoesqueleto de la célula, generando los NFTs (Takashima y cols., 1998).

GSK-3 β

Como kinasa principal de tau, la GSK-3 β induce la hiperfosforilación como uno de los primeros pasos en la formación de los ovillos (Ishiguro y cols., 1993). Tanto la forma hiperfosforilada de tau como los oligómeros solubles de esta proteína han sido relacionados con

la pérdida de sinapsis en ratones normales, mientras que los oligómeros granulados están vinculados a una pérdida de neuronas en ratones con la variante P301L de tau mutada (Kimura y cols., 2010). Así, tanto los oligómeros solubles, como los intermedios y los granulares son capaces de promover una disminución del transporte intracelular, y la pérdida de sinapsis y neuronas antes de la formación de los ovillos (Fig. 4). Esto sugiere que más que causar la muerte celular, lo que los ovillos facilitan es el entorno para que esta tenga lugar, lo que apunta a la activación de la GSK-3 β como posible requisito en la patogénesis de la EA (Takashima, 2012). Con esto, es posible que el déficit en la memoria se produzca cuando estos ovillos se encuentran en la corteza entorrinal y el hipocampo, dado que la pérdida neuronal y de sinapsis tiene lugar antes de la formación de los ovillos en estas regiones. Estudios previos han observado que ratones que sobre expresan GSK-3 β exhiben acumulación de tau hiperfosforilada, muerte neuronal en el hipocampo y deterioro de memoria medida con el test de reconocimiento de objeto (Fuster-Matanzo y cols., 2011). Adicionalmente, estos ratones muestran una reducción en los potenciales a largo plazo (PLP) hipocampales, pudiendo revertirse el déficit en memoria deteniendo la expresión de tau (de Barreda y cols., 2010). La β A activa GSK-3 β , que induce la hiperfosforilación de tau en las neuronas del hipocampo, y es esta activación de GSK-3 β la que conduce a un decremento en los PLP, con el consiguiente declive de la memoria. Una vez más, resultados a favor de la idea de que la activación de GSK-3 β es un factor clave en el déficit de memoria asociado a la EA, lo que abre una interesante alternativa para los inhibidores de GSK-3 β como posibles dianas terapéuticas de esta enfermedad (Hurtado y cols., 2012; Reitz, 2012).

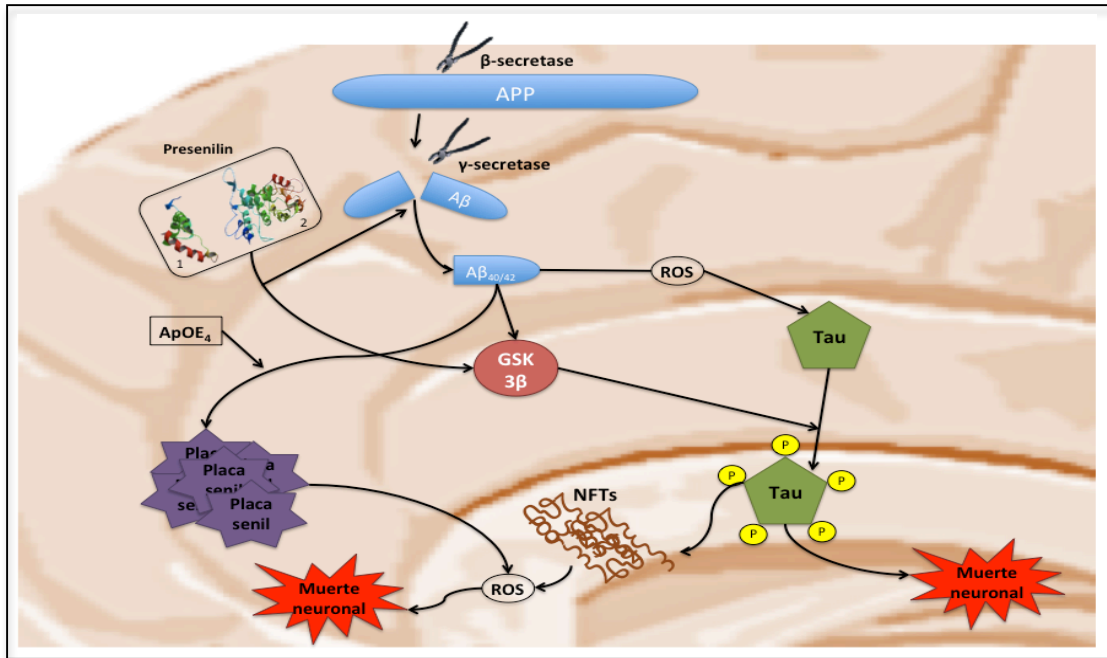


Fig. 4. Relación entre los principales elementos implicados en la EA. Mutaciones en la APP y la presilina pueden desencadenar el incremento de péptido $A\beta$. Una consecuencia de esto es el incremento en la actividad de la GSK-3 β , activada también por la acción de la presilina y cuya regulación se puede ver alterada ante la presencia de la isoforma 4 del APOE. Entre los substratos afectados por la activación de la GSK-3 β , se encuentra la forma hiperfosforilada de la proteína tau. Todos estos cambios pueden resultar en procesos tóxicos para la neurona, llegando a causar muerte neuronal.

3. Deterioro cognitivo asociado a la enfermedad de Alzheimer

3.1. Deterioro cognitivo y sistemas de neurotransmisión

La EA se caracteriza por la atrofia cortical, la marcada pérdida de neuronas y sinapsis, apoptosis, gliosis reactiva, NFTs intraneuronales y placas extra e intracelulares de proteína β A (Xiong y cols., 2004; Ballard y cols., 2011a). Aparte de lo comentado en el apartado anterior, existen otros muchos mecanismos además de los iniciados por β A y tau por los que la muerte neuronal se puede producir, como la apoptosis o la respuesta inflamatoria (Pascual y cols., 2011). En los últimos años ha aumentado considerablemente la cantidad de estudios que han relacionado la alteración de diferentes sistemas de neurotransmisión con el deterioro cognitivo de las enfermedades neurodegenerativas (Xu y cols., 2012), y la relación de estos con diversos problemas típicos en la demencia y el envejecimiento. Así, se sabe que neurotransmisores como la serotonina, la dopamina, la melatonina, el glutamato y la acetilcolina, están implicados en estos procesos.

Glutamato (Glut)

La regulación glutamatérgica juega un importante papel en la patogénesis de la muerte neuronal en las enfermedades neurodegenerativas (Proctor y cols., 2011). Especialmente en las que incluyen desarrollo de demencias, como ocurre en la EA, donde la modulación de los receptores glutamatérgicos N-Metil-D-Aspartato (NMDA) parece jugar un papel fundamental (Del Bel y Slater, 1991; Proctor y cols., 2011). En el desarrollo de la EA, la acumulación de tau hiperfosforilada y β A hiperactivan los receptores glutamatérgicos NMDA, provocando la entrada masiva de Ca^{2+} hacia el interior de las neuronas y la activación de enzimas diana, como la CaMK-II (Fig. 5), crítica en los procesos de memoria y aprendizaje (Paoletti y Neyton, 2007; Fortin y cols., 2010; Guetg y cols., 2010). También se ha descrito que la proteína tau puede

causar por sí misma la activación de estos receptores NMDA, derivando en diversos procesos de neurotoxicidad (Xu y cols., 2012). Debido a esto, no es de extrañar que muchos estudios se hayan centrado en la relación entre estos receptores y la EA. Por ejemplo, Mishizen-Eberz y colaboradores descubrieron la reducción significativa en la capacidad de unión de los receptores NMDA situados en el hipocampo y el estriado de ratones viejos y pacientes con EA, pudiendo relacionar esta disminución con el declive cognitivo y los niveles de ansiedad (Mishizen-Eberz y cols., 2004). Tsang y cols. (2008), demostraron que la subunidad NR2A de los receptores NMDA se encontraba disminuida en el giro orbitofrontal de pacientes con Alzheimer y en estados de alta ansiedad en comparación con pacientes con ansiedad baja. Estos resultados apoyan la idea de que cambios en la expresión de los receptores NMDA pueden estar relacionados con alteraciones psicológicas aparecidas con la edad (Tsang y cols., 2008). Alternativamente, un estudio pudo encontrar incrementos de este tipo de receptores en células positivas de capas profundas de la corteza prefrontal de pacientes con EA (Fang y cols., 2005). No obstante, hay que mencionar que existe colocalización de los receptores NMDA y caspasa-3, lo que podría indicar una contribución a la apoptosis neuronal y a la demencia aparecida en la EA (Fang y cols., 2005). En este sentido, se ha descrito que existe un aumento de la endocitosis de los receptores NMDA en neuronas corticales tras la aplicación de oligómeros de β A (Snyder y cols., 2005) y se ha correlacionado de forma positiva la hipermotricidad y conducta ansiosa con una regulación a la alta de los receptores NMDA en diferentes áreas cerebrales, sugiriendo una regulación del proceso psico-neurodegenerativo por parte de estos receptores (Wang y cols., 2009).

Acetilcolina (ACh)

La ACh es otro de los neurotransmisores implicados en los problemas cognitivos de las distintas afectaciones cerebrales asociadas a la edad, debido a su participación en varias funciones centrales, como el control voluntario del movimiento, la memoria o la atención

(Lindstrom, 1997). Existen dos tipos de receptores colinérgicos: nicotínicos (nACh) y muscarínicos (mACh). Está descrito que la distribución de los mACh abarca distintas áreas del SNC, como las cortezas periforme, motora primaria, somatosensorial, prefrontal y cingulada; el caudado, el putamen y varias regiones límbicas, como el núcleo accumbens y el hipocampo (Xu y cols., 2012). La aparición de estos receptores en estas áreas es sinónimo de la importancia de la ACh para el buen funcionamiento de muchas de las funciones superiores, por lo que se ha sugerido que la alteración de sus receptores está relacionada con la aparición de trastornos de estas funciones (Wang y cols., 2008).

La principal aferencia colinérgica de las neuronas corticales proviene de las neuronas del núcleo basal de Meynert (Kotagal y cols., 2012) La afectación que en la EA sufren las neuronas de este núcleo impide la correcta proyección colinérgica hacia estructuras corticales (Uchida y cols., 2011). A pesar de que los marcadores patológicos más característicos de la EA son la formación de conglomerados de β A y los NFTs de proteína tau, otros estudios relacionan los defectos en los receptores colinérgicos con los mecanismos patológicos de la EA (Medeiros y cols., 2011). De hecho, en estos pacientes se encuentra una reducción de la expresión de receptores nicotínicos en comparación con sujetos mayores sanos y sujetos con DCL (Sabbagh y cols., 2006). Siendo así, cada vez surgen más investigaciones sobre la participación de los mecanismos por los que la ACh y sus receptores en la mejoría de los déficits cognitivos en pacientes con EA. En este sentido, una de las vías que se ha señalado como fundamental es la vía de señalización de calcio mediada por receptores nACh, los cuales se cree que poseen un papel determinante en los procesos de aprendizaje y memoria asociados a la edad (Miwa y cols., 2006; Gubbins y cols., 2010).

La acumulación de β A y proteína tau en el cerebro es un aspecto fundamental de la patogénesis en Alzheimer, ya que estos péptidos de β A producen un efecto negativo a varios niveles en el sistema colinérgico, incluyendo alteraciones en la síntesis y liberación de ACh (Auld

y cols., 2002). Además, los oligómeros de proteína β A son capaces de modular la homeostasis de Ca^{2+} , los PLP y la plasticidad sináptica, mediante su unión a los receptores nACh y estimulando diferentes cascadas de señalización que conducen en última instancia al declive cognitivo (Lilja y cols., 2011).

Dopamina (DA)

En los últimos diez años se ha demostrado el papel de la DA en la regulación de la plasticidad sináptica y su implicación en la modulación de la disfunción cognitiva a través de distintas vías de señalización, como la cAMP/PKA , DARP-32 o CREB (Chang y Berg, 2001). Además, existe una estrecha interacción entre los sistemas dopaminérgico-colinérgico y dopaminérgico-glutamatergico, lo que podría estar en la base de importantes cambios en diversos procesos psicológicos, como la ansiedad, el aprendizaje o la memoria (El-Ghundi y cols., 2007). Sin embargo, aún existe discrepancia sobre el papel de los receptores dopaminérgicos en relación al deterioro cognitivo asociado a la edad y la EA. Aunque se reconoce la importancia de ambos tipos de receptor dopaminérgico (D1 y D2) en los problemas cognitivos asociados a la edad, existen también resultados que aseguran que, a pesar de que se encuentra una disminución de los receptores D1 en el caudado y putamen de pacientes con EA, no existe asociación entre el déficit cognitivo y la densidad de unión de los receptores D1/D2 en estas mismas áreas (Kemppainen y cols., 2000). Estos resultados pueden explicarse debido a que en este estudio no se identifica a los pacientes de EA con síntomas parkinsonianos. Aún con esto, se sabe que hasta un 30% de los pacientes que sufren EA muestran signos de parkinsonismo (Merello y cols., 1994). En este sentido, se ha demostrado que estos pacientes presentan una reducción significativa en los niveles de receptores D2, a diferencia de otros sujetos diagnosticados de EA sin trastornos del movimiento (Joyce y cols., 1998). Los mismos autores encontraron más tarde que la disponibilidad de los receptores D2 sí resultaba disminuida en el hipocampo, y que la alteración en los potenciales de unión de los D2 en esta misma área

correlacionaba positiva y significativamente con la capacidad de memoria verbal (Kemppainen y cols., 2003).

Serotonina (5-HT)

Distintas líneas de trabajo, tanto en investigación clínica como preclínica, señalan un papel de la 5-HT y sus receptores en diferentes aspectos de la disfunción cognitiva, como déficit cognitivo y problemas de aprendizaje y memoria (Meneses y Hong, 1999; Sumiyoshi y cols., 2007). Utilizando la tomografía por emisión de positrones (PET, por sus siglas en inglés), Truchot y colaboradores encontraron una reducción significativa en la densidad de receptores 5-HT_{1A} en las regiones de hipocampo, giro dentado inferior y giro occipital, en pacientes con EA, en comparación con sujetos sanos (Truchot y cols., 2008). Un resultado similar se ha encontrado en las cortezas frontal y temporal de pacientes con EA (Lai y cols., 2005). Concretamente, en estas áreas la disminución se produce principalmente en los receptores 5-HT_{2A} y 5-HT₆, en comparación con sujetos sanos. El interés por este último receptor está motivado principalmente por su papel en la modulación de múltiples mecanismos del SNC, como la ingesta (Frassetto y cols., 2008) o el estado de ánimo (Carr y cols., 2010). Respecto a su distribución, el 5-HT₆ se localiza principalmente en el estriado, hipocampo y corteza cerebral (Ruat y cols., 1993; García-Alloza y cols., 2004); áreas estrechamente relacionadas con las funciones afectadas en el envejecimiento. Es más, existen varios trabajos que demuestran que el bloqueo de estos receptores 5-HT₆ logra una mejora significativa en el aprendizaje y en la memoria de sujetos enfermos (Mitchell y Neumaier, 2005; Perez-García y Meneses, 2005). Otra cuestión a propósito del 5-HT₆ es la interacción que este receptor mantiene con el Glut y la ACh, ambos necesarios para que los procesos de aprendizaje y memoria sean adecuados (Schechter y cols., 2008; West y cols., 2009). La alteración de la actividad de estos receptores puede ir asociada con la formación de placas amiloideas y niveles neurotóxicos de proteína tau, así como con la

modulación del estrés oxidativo consecuente, relacionado con la toxicidad neuronal y que resulta finalmente en un déficit cognitivo (Xiong y cols., 2004).

Melatonina

La melatonina se sintetiza en la glándula pineal, o epífisis. Su síntesis comienza por un proceso de acetilación y de metilación de la 5-HT. La importancia de esta hormona está tradicionalmente ligada al sueño, aunque en los últimos años se ha investigado su papel en otro tipo de funciones, obteniendo cierto éxito en terapias para trastorno bipolar o afectivos, por ejemplo (Carney y Shelton, 2011). La síntesis y liberación de melatonina por el núcleo supraquiasmático (NSQ) está sometida a un ritmo circadiano, aumentando en periodos de oscuridad (Hardeland, 2012) y regulada por esta misma estructura mediante un proceso de feedback negativo (Pandi-Perumal y cols., 2006).

Especialmente en la EA y en otros tipos de demencia asociada a la edad, los niveles de melatonina resultan significativamente más bajos que en sujetos control de la misma edad (Skene y Swaab, 2003; Kripke y cols., 2005) llegando incluso a suprimir su ritmicidad (Skene y Swaab, 2003). Varios estudios llaman la atención sobre algunos casos de EA, en los que la severidad de las alteraciones en los ritmos circadianos se ha relacionado directamente con el deterioro cognitivo (Skene y Swaab, 2003; Schmidt y cols., 2012). En estos mismos pacientes se ha visto que la liberación de melatonina resulta muy irregular (Mishima y cols., 1999), lo que se ha relacionado tanto con la edad como con la severidad del declive cognitivo (Skene y Swaab, 2003). Por su parte, Matsubara y colaboradores (2003) demostraron que la administración temprana de melatonina, mantenida a largo plazo, reducía significativamente la cantidad de placas de β A en ratones mutantes y que el tratamiento con esta hormona mejoraba ostensiblemente algunos parámetros relevantes de la enfermedad, como el daño oxidativo o la presencia de conglomerados de proteína β A (Matsubara y cols., 2003). Estos trabajos ponen de manifiesto la relación existente entre la melatonina y la EA. Otros estudios con ratones mutantes

para la APP muestran una reducción de la muerte neuronal y en el daño al sistema colinérgico tras un tratamiento crónico con melatonina (Feng y cols., 2004a), lo que apoya los resultados favorables en las pruebas conductuales llevadas a cabo tanto en estos animales como en ratas adultas (Feng y cols., 2004b).

En suma, el papel de estos neurotransmisores (Glut, ACh, etc.) tanto en la aparición como el desarrollo de la EA está siendo ampliamente estudiado todavía hoy. Sin embargo, los trabajos realizados parecen confirmar la relación entre los distintos sistemas de neurotransmisión y los distintos problemas cognitivos típicamente aparecidos tanto en la EA como en otras demencias asociadas a la edad.

3.2. Farmacoterapia en la EA

La farmacoterapia en la EA se centra principalmente en los sistemas glutamatérgico y colinérgico, así como en la sintomatología derivada de su deterioro: problemas de memoria, atención, orientación... De este modo, las diferentes familias de fármacos se engloban en función de sus variadas acciones sobre los diferentes sistemas de neurotransmisión. Sin embargo, hoy se considera que estos tratamientos son de acción principalmente paliativa, no curativa, ya que en el momento de la manifestación de los primeros síntomas de deterioro cognitivo, la enfermedad se encuentra en un punto de no retorno. En este sentido, los objetivos clínicos del tratamiento de la EA son tres: 1) minimizar/eliminar los síntomas cognitivos; 2) minimizar/eliminar los síntomas conductuales de la demencia; y 3) ralentizar el progreso de la enfermedad. No obstante, las alternativas actuales no son totalmente capaces de cubrir estas demandas, lo que hace imprescindible la investigación con estas estrategias en el campo del desarrollo preclínico. A día de hoy, existen dos grandes familias de fármacos para la EA.

Inhibidores de la acetilcolinesterasa

La acetilcolinesterasa es la enzima responsable de la degradación de la ACh en el espacio sináptico. Dada la importancia de este neurotransmisor en el envejecimiento cerebral, tanto normal como patológico, la idea de fármacos que actúen inhibiendo la actividad de esta enzima tiene como objetivo maximizar la función del neurotransmisor cuando este está presente. A pesar de las ligeras diferencias entre los distintos tipos de inhibidores de la acetilcolinesterasa (IACE), todos ellos comparten la propiedad de restringir la degradación de ACh. El tratamiento con IACE es el de primera elección, habiendo logrado reducir significativamente algunas manifestaciones conductuales de la EA (Birks y cols., 2006; Birks y Harvey, 2009). Sin embargo, a pesar de las pruebas realizadas, existe todavía cierto debate acerca de su eficacia, dado que únicamente responden a esta medicación un 30–40% de los pacientes (Ballard y cols., 2011b). Principalmente, los IACE han demostrado su validez clínica en pacientes de EA con sintomatología moderada (Ballard y cols., 2011b). Las últimas revisiones sobre esta familia de fármacos defienden su fiabilidad en el retraso del declive cognitivo y una mejora general de los síntomas conductuales, tanto en pacientes con DCL como con EA avanzada (Ballard y cols., 2011b; Rodríguez y cols., 2012). En las últimas décadas el avance en investigación en los IACE ha logrado mejorar considerablemente la calidad de estos minimizando la aparición de efectos secundarios y mejorando la efectividad de los anticolinesterásicos de primera generación.

Antagonistas de los receptores NMDA

Otra de las familias de fármacos utilizadas en el tratamiento de la sintomatología de la EA es la de los antagonistas de los receptores NMDA, en concreto, la memantina (McShane y cols., 2006; Rodríguez y cols., 2012). El papel fundamental de los receptores NMDA en el aprendizaje y la memoria hace que la utilización de antagonistas de estos receptores haya encontrado resultados como elementos que deterioran estas funciones (Collingridge y cols., 2013). Sin embargo, a pesar de que el antagonismo de los receptores NMDA es capaz de

provocar deterioro en el aprendizaje y la memoria, también se han utilizado como tratamiento en la EA, logrando un retraso en la aparición y el desarrollo de los problemas cognitivos asociados a esta enfermedad (Danysz y Parsons, 2003). En este sentido, existe controversia acerca del papel que desempeñan los receptores NMDA en la sintomatología de la EA (Doraiswamy, 2003). Por una parte, se ha relacionado el antagonismo de estos receptores con la aparición del deterioro de aprendizaje y la memoria, pero por otra parte constituyen uno de los tratamientos de elección para el retraso de la aparición y desarrollo de los problemas asociados. Uno de los mecanismos de acción propuestos para el efecto positivo sobre la cognición es que logran inhibir la hiperactivación patológica de estos receptores y permite una función fisiológica con niveles normales de activación (Coan y cols., 1989). La administración de memantina provoca la ocupación los canales iónicos y los libera ante la despolarización originada por la aparición de PLP (Bresink y cols., 1996; Fitzjohn y cols., 2008). No obstante, a pesar de la evidencia en favor de la memantina como estimulador cognitivo, la mayoría de informes acerca del efecto sobre la cognición otorgan a la memantina una acción moderada (Collingridge y cols., 2013).

4. Sueño, estrés, edad y memoria

Uno de los objetivos de la presente tesis doctoral es intentar relacionar los procesos de sueño, estrés, edad y memoria. Este trabajo intenta explorar los mecanismos por los cuales el deterioro cognitivo asociado a la edad pueden estar mediados por el sistema de respuesta al estrés. Para ello, es necesario conocer un poco más a fondo cada uno de los aspectos que se tienen en cuenta para la *rationale* de este trabajo.

4.1. Bases estructurales del ciclo vigilia-sueño

El sueño es una conducta. Dormir es necesario, tanto para los humanos como para el resto de especies animales. Aunque se tiende a pensar en el sueño como un estado de consciencia más que como una conducta en sí misma, se pueden distinguir claramente dos estados: a) la vigilia (o fase en la que estamos despiertos conscientes) y b) el sueño. En los mamíferos, los ritmos circadianos regulan una gran variedad de procesos cíclicos, siendo el sueño uno de especial relevancia por su papel funcional en procesos de aprendizaje y de memoria, así como en la atención o en la estabilidad emocional (McClung, 2007; Benedetti y cols., 2007; Benedetti and Colombo, 2011). Asimismo, se sabe que el sueño es uno de los principales marcadores que se ven afectados en diferentes tipos de demencia asociada a la edad (McEwen, 2006; Hardeland, 2012). La forma en que tradicionalmente se ha estudiado el ciclo de sueño-vigilia es mediante el uso de la electroencefalografía (EEG), debido a que ambos estados presentan tipos de ondas cerebrales diferentes y claramente distinguibles. En la vigilia, las ondas cerebrales muestran, de forma general, dos patrones de actividad: alfa y beta (Iber y cols., 2007). La actividad alfa consiste en ondas regulares de frecuencia media (8 — 12 Hz), y aparecen bajo estados de relajación que no requieren una actividad mental exigente. Por su

parte, la actividad beta consiste en ondas irregulares de baja amplitud (13 — 30 Hz), siendo más frecuente en momentos de exigencia cognitiva y alerta.

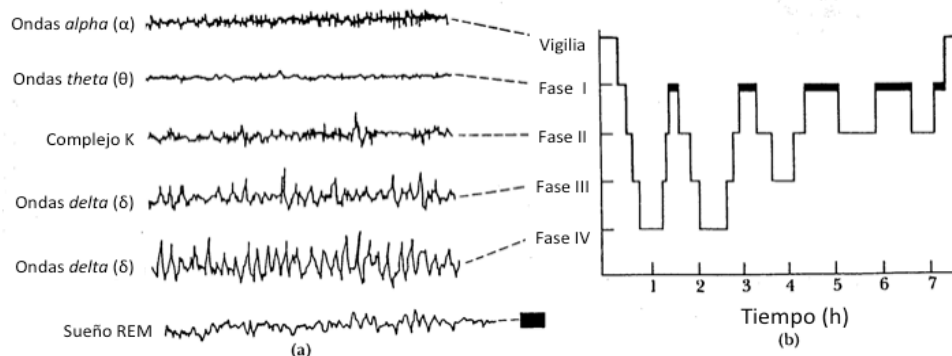


Fig. 5. Esquema de las fases del sueño y vigilia. (a) Descripción gráfica de la señal de EEG durante las diferentes fases del sueño y la vigilia. (b) Hipnograma que representa las fases del sueño durante un ciclo de sueño de ocho horas en adulto.

El periodo de sueño, por su parte, presenta una arquitectura distinta. Se compone de dos fases bien diferenciadas y alternas: Una fase REM (siglas en inglés de «*Rapid Eye Movement*») y una fase NREM (o non-REM; siglas en inglés de «*Non Rapid Eye Movement*»), el cual está a su vez subdividido en tres estadios: N1, N2 y N3, o sueño de onda lenta (Iber y cols., 2007). En el momento en que se inicia el sueño, el cerebro comienza a registrar cierta actividad de onda theta (3,5 — 7,5 Hz), característica del primer ciclo No-REM. Según pasa el tiempo, aparecen otros elementos de la arquitectura del sueño, como los husos del sueño o los complejos K, hasta llegar al sueño de onda lenta, en el que predomina la señal delta (0,5 — 2 Hz). Tanto las ondas alfa y beta, características del periodo de vigilia, como las theta y delta vistas durante el sueño, han sido relacionadas con trastornos neurodegenerativos asociados a la edad. Según diferentes estudios de EEG, pacientes con EA presentan una reducción en la actividad de ondas alfa y beta (Kogan y cols., 2001; Babiloni y cols., 2011) durante la vigilia, pero también una característica reducción en la actividad cerebral durante el sueño REM y en la actividad de onda lenta (Kogan y cols., 2001; Vitiello y Borson, 2001), así como una disminución significativa en la actividad de las ondas theta y delta durante el sueño NREM (Vitiello y Borson,

2001; Jyoti y cols., 2010; Babiloni y cols., 2011; Lizio y cols., 2011). Estos resultados han servido para sugerir que tanto las perturbaciones en el sueño como el sueño interrumpido son más frecuentes y severas cuanto más grave es el caso de demencia (Bliwise, 2004). Además, estos resultados se han relacionado con las múltiples complicaciones en el sueño que presentan las personas de edad avanzada (38% de los mayores de 65 años), y hasta más de un 40% de los pacientes diagnosticados de Alzheimer (Bliwise, 2004; Bombois y cols., 2010). Los datos muestran que el sueño REM depende de la actividad colinérgica, y que el deterioro del sueño está estrechamente ligado al alcance del deterioro de este sistema alrededor del SNC (Bliwise, 2004). Parte de esta evidencia se demostró con inhibidores de la colinesterasa, muy útiles en el tratamiento para ciertos síntomas típicos de los trastornos cognitivos asociados a la edad (Dodds y cols., 2011).

Es necesario señalar la relación entre el deterioro del sistema colinérgico y la aparición de disfunciones en el sueño, habiendo sido ambos factores asociados al deterioro cognitivo y a la edad. En un estudio reciente, Roh y colaboradores (2012) pudieron relacionar de forma directa la cantidad (y calidad) de sueño con los niveles de proteína β A acumulada. Estos investigadores observaron que la cantidad de β A presente en el líquido intersticial se ve alterada con la edad y la acumulación de esta proteína, y que a su vez presenta correlación con alteraciones de la conducta de sueño. En este trabajo se pudo demostrar que la eliminación de los depósitos de β A era capaz restaurar tanto el ciclo de sueño vigilia como el nivel de fluctuación de β A diurno, lo que propone a ambos elementos como indicadores del estado patológico (Roh y cols., 2012).

4.2. Memoria y Aprendizaje

El aprendizaje refleja una serie de complejos procesos neurales que consisten en varios principios: adquisición y procesamiento de información, almacenaje y recuperación. La adquisición inicial conduce a la modificación de conducta, siendo la recuperación de estas modificaciones conductuales la mejor forma de definir la memoria (Deiana y cols., 2011). Los

recuerdos pueden ser clasificados en función de su contenido (memoria declarativa/explicita; procedural/implícita), duración (memoria a corto-largo plazo), o su naturaleza, pudiendo ser esta almacenada o temporal (por ejemplo, la memoria de trabajo) (Deiana y cols., 2011). Se ha propuesto una dicotomía entre memoria declarativa y no declarativa (Squire, 2004) (Fig. 6). Según esta distinción, la primera comprendería aquellos recuerdos e información sobre las experiencias propias y el conocimiento que se tiene de los hechos del mundo que nos rodea, traídos a la consciencia de forma deliberada (Tulving, 2002). Por otra parte, la memoria no declarativa se refiere a toda aquella información que se forma a partir de la acumulación de experiencias, como los hábitos, condicionamientos, etc., y es comúnmente aceptado que no depende del hipocampo (Squire, 2004). Ambos tipos de memoria son posibles gracias a una serie de condiciones, entre las cuales resalta el papel de procesos moleculares como la potenciación a largo plazo (PLP) y la actividad colinérgica en diferentes áreas cerebrales (Walker y Stickgold, 2006).

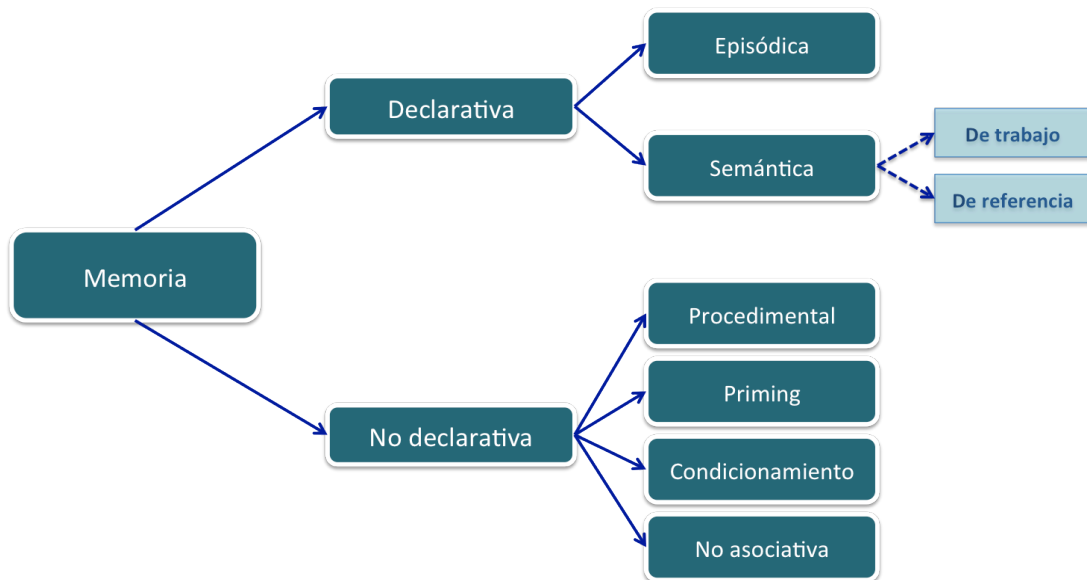


Fig. 6. Taxonomía de la memoria. La memoria declarativa incluye los recuerdos accesibles de forma consciente, basados en información de hechos y conocimiento sobre el mundo (saber «qué»). La memoria episódica (experiencias propias pasadas) y la memoria semántica (recuerdos de conocimiento general), forman parte de esta categoría. Por su parte, la memoria no declarativa incluye la memoria implícita y la información relacionada con el conocimiento procedural (saber «cómo») (Squire y Wixted, 2011).

Tanto la memoria episódica como la espacial, que son las dos principales medidas en este trabajo, pertenecen a la rama semántica de la memoria declarativa, según diferentes taxonomías (Deiana y cols., 2011). A lo largo de los años se ha demostrado que este tipo de memoria es dependiente del hipocampo (Crystal, 2010). En este sentido, se considera que la memoria espacial es una de las formas de procesamiento cognitivo más avanzado en los mamíferos, e incluye la capacidad para almacenar información acerca del entorno de uno mismo y su orientación en el espacio (Begega y cols., 2012). Está considerada parte de la memoria episódica, como se ha mencionado previamente, aunque en raras ocasiones como parte de la memoria semántica. La orientación espacial puede servirse de claves ambientales para la formación y reconstrucción posterior de mapas cognitivos, esto es, una representación interna del entorno (O'Keefe y Nadel, 1978). Para la formación de estas representaciones, se ha sugerido que existen principalmente dos tipos de estrategia (Deiana y cols., 2011):

- 1) Una estrategia egocéntrica es aquella que define al individuo en relación a los objetos, el objetivo y las claves disponibles dentro del propio paradigma.
- 2) Una estrategia allocéntrica define al individuo en función de la localización de los objetos dentro del entorno global que los rodea.

Múltiples estudios han demostrado que ambos tipos de estrategia son evaluables mediante diferentes paradigmas conductuales, entre los que se encuentra tanto el laberinto radial (Radial Arm Maze) (Begega y cols., 2012), como el laberinto de Barnes (Barnes Maze) (Popovic y cols., 2010). Otros estudios han demostrado que tanto el hipocampo como el sistema colinérgico son fundamentales para la adquisición de información cuando se sigue una estrategia allocéntrica (Deiana y cols., 2011). Pero ¿cómo se generan los recuerdos? ¿Cómo pasa la información de estar disponible en el ambiente a formar parte del bagaje de las propias experiencias?

Mecanismos moleculares para la formación de recuerdos: el papel del hipocampo y la Potenciación a Largo Plazo

Para que se forme un recuerdo entran en juego varios fenómenos y elementos diferentes. Uno de estos fenómenos es la PLP (Cooke and Bliss, 2006). La estimulación eléctrica de circuitos de la formación hipocampal puede desembocar en cambios sinápticos, más o menos permanentes, a largo plazo. Estos cambios sinápticos parecen ser los responsables del aprendizaje (Walker y Stickgold, 2006). La PLP se puede describir como el aumento a largo plazo que se produce en la excitabilidad de una neurona ante una aferencia sináptica determinada, debido a una actividad de alta frecuencia de esta última (Hebb, 1949; Cooke y Bliss, 2006).

El hipocampo juega un papel fundamental en la memoria, en tanto que ejerce, entre otras, una función determinante en el almacenamiento de la información nueva antes de que esta se consolide (Harand y cols., 2012). La formación hipocampal se localiza en el lóbulo temporal e incluye el complejo subicular, el hipocampo y la circunvolución dentada. Sus principales aferencias y eferencias neocorticales se conducen a través de la corteza entorrinal, la cual transmite la información aferente a la circunvolución dentada mediante la vía perforante. Estas neuronas envían axones al CA3, donde establece sinapsis con las células piramidales de éste. Los axones de estas células piramidales proyectan hacia el CA1 adyacente y hacia el trigono cerebral, hasta estructuras del prosencéfalo basal, concretamente al área septal y a los cuerpos mamilares. Las neuronas de CA1 son la principal fuente de eferencias del hipocampo, de éstas surgen axones a neuronas del complejo subicular, desde donde se proyectan hacia la corteza entorrinal y al prosencéfalo basal, a través de la fimbria y fórnix. La información consolidada pasa de ser contenida en el hipocampo a distribuirse por la corteza prefrontal, formando lo que se conoce como la memoria a largo plazo (Córdoba-Montoya y cols., 2010; Squire y Wixted, 2011). Sin embargo, la PLP por sí misma no es suficiente. Una de las características que presenta la PLP es que el rápido ritmo de estimulación hace posible que los

potenciales excitatorios postsinápticos se sumen, ya que cada uno de los sucesivos potenciales ocurre antes de que el anterior se extinga (Hebb, 1949). Una consecuencia de esto es que la membrana celular permanece más tiempo despolarizada, en comparación con una tasa de disparo neuronal basal.

Se sabe que cuando las moléculas de un neurotransmisor se unen a los receptores postsinápticos de una espina dendrítica despolarizada, la sinapsis se refuerza (Cooke y Bliss, 2006). Experimentos entorno a este asunto han concluido que la LTP requiere: a) activación de la sinapsis, y b) despolarización de la membrana postsináptica. El neurotransmisor implicado en este proceso es el Glut, cuyos efectos postsinápticos modula los receptores NMDA (Molnár, 2011).

El receptor NMDA es abundante en la formación hipocámpal (Geddes y cols., 1986), donde controla la apertura de un canal dependiente de Ca^{2+} que, habitualmente, se encuentra bloqueado por un ión Mg^{2+} . Sin embargo, cuando la membrana es despolarizada, el Mg^{2+} se libera al espacio sináptico y el Ca^{2+} puede introducirse en la célula: el Ca^{2+} sólo puede entrar en la célula cuando el Glut está presente y la membrana postsináptica está despolarizada, sin embargo, como se observa en la figura 7, para que este proceso ocurra es necesaria la participación de los receptores ácido propionico de alfa amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol (AMPA), encargados de iniciar el potencial de acción mediante su canal de Na^{2+} (Cooke y Bliss, 2006).

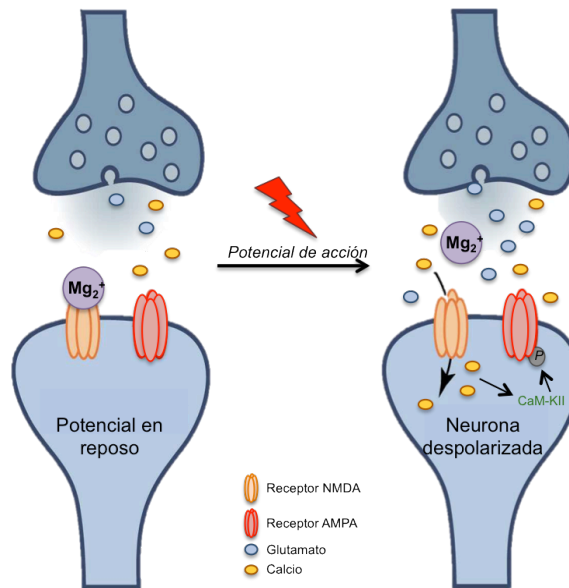


Fig. 7. Potencial de acción. Cuando la neurona postsináptica permanece en reposo, un ion de magnesio (Mg^{2+}) bloquea la entrada del receptor NMDA. Ante la liberación de Glut, cuando la membrana es despolarizada mediante un potencial de acción el ion Mg^{2+} se libera y permite la entrada de calcio (Ca^{2+}) al interior de la célula, donde activa la CaMK-II. Una vez activada, la CaMK-II puede influenciar las propiedades fisiológicas de la célula, fosforilando al receptor AMPA.

Si las sinapsis débiles se activan por sí mismas, no sucede nada, ya que la membrana de la espina dendrítica no se despolariza lo suficiente para abrir los canales de Ca^{2+} NMDA. Pero si la actividad de las sinapsis fuertes localizadas en alguna otra parte de la neurona postsináptica provoca que ésta se descargue, una espina dendrítica despolarizará la membrana lo suficiente como para que el Ca^{2+} penetre en la célula. Así, las propiedades del receptor NMDA no sólo explican la PLP, sino también su factor de asociabilidad. Cuando una sinapsis se fortalece, se dan dos tipos de modificaciones: a) las sinapsis individuales se refuerzan (dependiendo de la activación de receptores AMPA), y b) proliferan nuevas sinapsis.

5. Efecto de la edad sobre el sueño y la memoria

El sistema colinérgico es uno de los sistemas de neurotransmisión más relevantes para el buen funcionamiento del proceso cognitivo en general, y la memoria en particular. Es el encargado de la síntesis del neurotransmisor ACh, y además de encargarse de mediar la actividad sináptica en el cerebro y regular aspectos tan importantes como la plasticidad neuronal, el arousal o el refuerzo, juega un papel determinante en múltiples funciones del sistema nervioso autónomo, como la contracción de la musculatura lisa y rugosa. El sistema colinérgico resulta de gran importancia en el modelaje tanto estructural como funcional de las neuronas, por lo que resulta de especial relevancia en el proceso de envejecimiento, tanto normal como patológico (Schielbs y Arendt, 2011).

5.1. Memoria y envejecimiento: papel del sistema colinérgico

El envejecimiento fisiológico y los trastornos neurodegenerativos encuentran en el déficit colinérgico un punto en común (Yankner y cols., 2008), ya que la reducción de la actividad de la ACh no sólo aparece en el primero, sino también en prácticamente todos los tipos de demencia (Grothe y cols., 2012; Haense y cols., 2012). No obstante, la naturaleza de este déficit es fundamentalmente distinta en los detalles. En el envejecimiento fisiológico, la pérdida de ACh se debe principalmente al desgaste dendrítico, sináptico y axonal (Schielbs y Arendt, 2011), en cambio, en los pacientes con EA la afectación colinérgica presenta un perfil distinto, ya que el déficit está principalmente causado por la muerte neuronal (Yankner y cols., 2008).

Uno de los factores más importantes relacionados con la ACh es el factor de crecimiento neurotrófico (NGF, por sus siglas en inglés) (Kato-Semba y cols., 1998), encargado no sólo de equilibrar el ratio entre crecimiento y muerte neuronal, sino también de la protección de las neuronas colinérgicas (Sofroniew y cols., 2001). Este es un punto importante, porque es la primera diferencia con el envejecimiento normal. Mientras que en este, el déficit colinérgico se

debe a una falta de función del propio sistema, en personas con DCL o estadios previos de EA, lo que se encuentra es una disminución en la actividad del NGF (Schielbs y Arendt, 2011). Más concretamente, se ha visto que los pacientes con DCL presentan principalmente una regulación a la baja de los principales receptores de NGF, el trkA y el p75NTR (Costantini y cols., 2005; Mufson y cols., 2007). Esto provoca que la forma previa del NGF, el pro-NGF, se acumule y provoque un desequilibrio que da lugar en último término a los problemas de memoria y demás facultades cognitivas que se ven clásicamente alteradas en la vejez, sin embargo, la relación entre neurodegeneración colinérgica y EA es de carácter especial.

Se ha descrito que la correlación entre neurodegeneración y placas solubles es mayor que con las placas insolubles, diana tradicional de las investigaciones (Ferrer, 2012; Marchesi, 2012). Es cierto que estos conglomerados terminan formando placas, y que éstas a su vez, potencian la neurodegeneración. Se dice que esto se produce debido a la muerte neuronal, y que ésta puede ser debida a una disfunción de la eficiencia en la gestión de recursos energéticos (Bigl y cols., 2003). Las neuronas colinérgicas tienden a requerir un mayor aporte energético para funcionar. Para formar ACh, es necesario que la acetil-CoA esté disponible, la cual se obtiene a partir de la degradación de la glucosa durante la glucólisis. Uno de los efectos de la acumulación extracelular de proteína β A se produce sobre la fosfofrutokinasa (PFK, por sus siglas en inglés), una de las principales enzimas en la glucólisis cerebral. Así, cuando hay una presencia significativa de placas de β A, se produce una interferencia que impide a la neurona acceder de forma totalmente eficiente a su principal fuente de abastecimiento energético (Bigl y cols., 2003).

En suma, los diferentes estudios aportan gran cantidad de información sobre las diferencias en el deterioro del sistema colinérgico en función del tipo y calidad de envejecimiento que al que está expuesto un individuo. Así, por ejemplo, en el envejecimiento fisiológico existe una degeneración en las dendritas, axones y neuronas colinérgicas, aunque no se encuentra un

grado significativo de muerte neuronal, sino más bien en la funcionalidad de estas células. Por su parte, en el DCL y estadios previos de la EA, a pesar de que la muerte neuronal se encuentra reducida significativamente, el déficit colinérgico viene dado por desequilibrios en la expresión de NGF (y sus receptores, trkA y p75NTR), proNGF y cambios en la liberación de ACh. Por último, en la EA, esta neurodegeneración coexiste con la acumulación de β A y NFT.

5.2. Sueño y envejecimiento

Las personas de edad avanzada refieren recurrentes quejas acerca de la calidad y la cantidad de horas de sueño que realizan, incluyendo desde sueño interrumpido a estados de excesivo adormecimiento durante el día (Vitiello y cols., 2004). Mediante estudios con polisomnografía, la información aportada por estos autoinformes ha podido ser confirmada (Crowley, 2011). Un metaanálisis de más de 65 estudios, con un total de 3.577 sujetos adultos de distintas edades concluyó que mientras el porcentaje de sueño ligero durante la fase NREM aumentaba, el sueño REM y el sueño de ondas lentas disminuían en función de la edad (Ohayon y cols. 2004). Estos resultados sugerían que los cambios en el sueño asociados a la edad pueden ser evidentes ya en los participantes jóvenes y adultos de mediana edad. Los cambios en el sueño de ondas lentas representan uno de los parámetros asociados a la edad más significativos, debido a las propiedades y funciones (especialmente las relacionadas con la memoria) que se han vinculado a este tipo de sueño (Bliwise, 2003; Born y Wilhem, 2012).

A pesar de las diferencias interindividuales, es un hecho que durante el envejecimiento, el pico nocturno de melatonina decrece. Esto es así hasta el punto de que en multitud de personas de edad avanzada, los valores nocturnos de esta hormona se hacen indistinguibles de los obtenidos durante el día (Hardeland, 2012). En tanto que pueda identificarse cierta ritmicidad en los niveles de esta hormona, los picos nocturnos en plasma suelen encontrarse con anterioridad en el tiempo en las personas más mayores, en comparación con adultos jóvenes (Skene y Swaab, 2003).

5.3. Memoria y estrés

La memoria es un proceso activo en el cual se retiene la información procedente del entorno de manera indiscriminada. Elementos como el contexto en que la información se desarrolla, la experiencia previa y variables fisiológicas aparentemente sin relación (como los niveles de glucosa en sangre), filtran qué detalles serán los que lleguen a almacenarse, así como el detalle con el que se almacenen. Uno de los filtros más importantes es el estado emocional. La memoria y la emoción son dos procesos psicológicos estrechamente relacionados. Existe amplia evidencia que demuestra que la retención de la información se ve facilitada bajo estados emocionales intensos (May y cols. 2012; Davis y Levine, 2013) y que los recuerdos son capaces de provocar respuestas emocionales vívidas, ya sea de forma consciente o inconsciente (Damasio, 2005; Davis, 2011; Lissek, 2012). Uno de los estados emocionales que más volumen de literatura ha generado en relación con la memoria es el estrés. La respuesta al estrés implica la activación del eje hipotalámico-pituitario-adrenal (HPA) (Ulrich-Lai y Herman, 2009). Esta activación consiste en la secreción de la hormona de liberación de corticotropina desde el hipotálamo, activando los receptores de esta hormona en la hipófisis (glándula pituitaria). La liberación posterior de la hormona adrenocorticotropa conduce a la secreción de corticoesteroides desde las glándulas adrenales al torrente sanguíneo. El inicio de esta respuesta de estrés viene acompañada, además, por la activación de otros neurotransmisores, entre los que se incluyen monoaminas y neuropéptidos (Joëls y Baram, 2009; Ulrich-Lai y Herman, 2009). En este sentido, sustancias que bloquean la liberación de Glut, o antagonistas de los receptores NMDA previenen la atrofia inducida por los glucocorticoides y el estrés, tanto en el hipocampo (Tamaki y cols., 2008) como en la corteza prefrontal (Martin y Wellman, 2011). Además, varios estudios demuestran que los glucocorticoides son capaces de potenciar la transmisión excitatoria en el hipocampo, afectando a una gran variedad de procesos postsinápticos, como la PLP, previamente mencionada (Yang y cols., 2008; Chen y cols., 2010).

Existen varios estudios que demuestran que el estrés afecta directamente al hipocampo, tanto su función como su estructura (McEwen, 2007; Howland y Wang, 2008; Chen y cols., 2010; Dorey y cols., 2012). En este sentido, se ha descrito que exposiciones a estrés crónico pueden derivar en déficits de memoria y procesos de PLP anormales (Sunanda Rao y Raju, 2000; Park y cols., 2001), y que estas alteraciones pueden ocurrir igualmente en el DCL asociado a la edad (Wilson y cols., 2007). Asimismo, el estrés agudo (entendido como de duración de minutos a horas) es capaz de afectar a la memoria de una forma similar (Diamond y cols., 2006; Bremner y cols., 2008; Conboy y cols., 2009), ejerciendo influencia sobre la PLP y reduciendo la densidad dendrítica de áreas como CA1 y CA3 del hipocampo (Stewart y cols., 2005; Chen y cols., 2008; Cazakoff y Howland, 2010). Se ha demostrado que los cambios producidos por el estrés a este nivel pueden ser revertidos con el tiempo (McEwen, 2007). Sin embargo, la exposición a una fuente de estrés prolongada puede generar cambios más duraderos, incluso morfológicos e irreversibles (Sapolsky y cols., 1985; Mizoguchi y cols., 1992). Otro factor relevante para este trabajo es el descubrimiento de que en este tipo de situaciones, los individuos de mayor edad presentan una mayor afectación por los niveles de estrés disponibles (Kerr y cols., 1991; Garrido 2011). Estudios llevados a cabo en hipocampo de roedores añosos han corroborado que la edad es un factor que potencia el efecto de los estresores sobre esta estructura (Eldridge y cols., 1989; Sodero y cols., 2011; Vanguilder y cols., 2012).

5.4. Estrés, sueño y memoria: paradigma de la privación de sueño

Entre las diferentes causas que pueden estar detrás de la reducción y pérdida funcional de la melatonina en el envejecimiento, el estrés es un factor que se ha postulado como relevante. Así, en diversas ocasiones se ha demostrado que existe una relación entre la respuesta al estrés y la regulación circadiana del organismo (Corbett y cols., 2008; Gonnissen y cols., 2012; Olbrich y Dittmar, 2012). El estrés ha sido estudiado ampliamente desde el campo de la investigación básica. En términos metodológicos, existen hoy una gran variedad de

paradigmas para inducirlo, no sólo como un objetivo final, sino como forma de activación de una vía que induce otras condiciones relacionadas con el estrés, como la depresión o la ansiedad (Anisman y Matheson, 2005). Sin embargo, la mayoría de los modelos que se utilizan presentan varias dificultades que, aunque resultan determinantes, no se esquivan fácilmente en lo que se refiere al estudio de los ritmos circadianos (Havekes y cols., 2012), al estrés (Dorey y cols., 2012) y a la interacción entre ambos (Galvão y cols., 2008). A pesar de voces discrepantes (Vertes, 2004), ha sido probado repetidamente la necesidad del periodo de sueño para la buena consolidación y recuperación de determinados tipos de memoria: procedimental (Diekelmann y cols., 2009), declarativa (Pace-Schott y cols., 2009), o de trabajo (Voderholzer y cols., 2011); y que la falta de sueño afecta de manera severa a la ejecución de tareas cognitivas (Durmer y Dinges, 2005). No obstante, ciertas tareas son más sensibles a la privación de sueño que otras: en la memoria asociada al reconocimiento facial, por ejemplo, permanece intacta en sujetos privados de sueño durante periodos de hasta 35 horas, aunque sí se altera el recuerdo del contexto en que estas caras aparecieron (Sheth y cols., 2009).

Mediante el control del sueño, el reloj interno influye de forma inevitable el proceso cognitivo, y reduce su capacidad durante los periodos de inestabilidad circadiana presumiblemente asociada a la privación de sueño (Kyriacou y Hastings, 2010) y a la desincronización forzada, en los cuales se impide dormir al sujeto durante un periodo completo de 24 horas, tal y como ocurre en el paradigma de privación de sueño que se plantea en este trabajo. Se ha propuesto que el deterioro de la memoria causado por la privación de sueño viene dado por el efecto que esta tiene sobre la PLP en el hipocampo (McDermott y cols., 2006). Sin embargo, varios autores sugieren diferentes mecanismos por los cuales este fenómeno puede ocurrir (Patti y cols., 2010), atribuyéndolo a reducciones en el tiempo de reacción (Polzella y cols., 1975), o a alteraciones motoras (Gruat-Masso y cols., 1995). De cualquier modo, siendo que la memoria se ve afectada en gran medida por las condiciones ambientales, podría decirse

que las alteraciones conductuales inducidas por la privación de sueño contribuyen al efecto amnésico a través de un proceso dependiente de estado (Galvão y cols., 2008). En este sentido, en roedores (Aleisa y cols., 2011a) y en humanos (Jugovac y Caballero, 2011), la privación de sueño ha demostrado ser capaz de perjudicar la respuesta cognitiva en aquellas tareas que son particularmente dependientes de la función del hipocampo, como la memoria espacial (Graves y cols., 2003), medida en la piscina de Morris (Smith y Rose, 1997) o en el Radial Arm Maze (Smith y cols, 1998).

5.5. Sueño y estrés

Tanto el estrés crónico como el estrés agudo poseen un pronunciado efecto sobre la arquitectura del sueño y la ritmicidad circadiana, tanto en humanos como en modelos murinos (Cano y cols., 2008; Grønli y cols., 2012). Estudios en animales (Cano y cols., 2008) y en humanos (Antonijevic, 2008) desvelan la existencia de fuertes interacciones entre el sistema circadiano y la respuesta al estrés. Estos datos indican que la respuesta de un organismo a un estresor agudo varía en función del momento del día en que el estímulo se presenta por lo que esta relacionado con el sistema circadiano (Cano y cols., 2008). Experimentos de estrés agudo en distintos roedores confirman estos datos. Estudios llevados a cabo en hamsters indican que bajo condiciones de estrés agudo, estos animales son capaces de reiniciar la señal del reloj biológico (Van Reeth y cols., 1991), lo que apoya la idea de una relación entre estrés y sistemas fisiológicos circadianos de carácter adaptativo. Por otra parte, el factor de liberación de corticotropina del hipotálamo de ratas está implicado en la regulación fisiológica del despertar, así como en las modificaciones en el ciclo sueño-vigilia inducidas por la exposición a estresores agudos (Opp, 1995), y por cambios en la fase de sueño REM (Gonzalez y cols., 1997).

6. *Octodon degus* como modelo para el estudio de enfermedades neurodegenerativas y deterioro cognitivo asociado a la edad

La hipótesis de la cascada amiloidea es una de las más apoyadas actualmente para explicar la EA (Hardy y Gwinn-Hardy., 1998; Marchesi, 2012). Partiendo de esta hipótesis, los modelos transgénicos devienen de las tres principales características identificadas clave en la EA: la proteína APP, la PSEN1 y PSEN2, y la proteína tau (Hock y Lamb, 2001), con el objetivo de desarrollar la característica acumulación de amiloide y NFTs (Oddo y cols., 2003). La principal ventaja de estos modelos es su éxito en la reproducción de un resultado fisiopatológico y conductual similar al observado entre los pacientes con EA (Oddo y cols., 2003; Richardson y cols., 2003). Sin embargo, aunque los modelos transgénicos han demostrado su utilidad para el estudio de la EA, plantean importantes restricciones. La limitación más importante que estos modelos presentan es la necesidad de la manipulación genética y/o farmacológica para alcanzar el estado inherente fisiopatológico de la EA y otros estados neurodegenerativos. Por ejemplo, se sabe que los pacientes con EA muestran una pérdida masiva de neuronas (Muhammad y cols., 2007; Jacobs y cols., 2012), y esta función tiene que ser implantada en el ratón porque incluso los modelos transgénicos no muestran una pérdida de magnitud similar sin manipulación (Calhoun y cols., 1998; Reyes y cols., 2004). Otro aspecto importante de la EA de la que carecen estos modelos es la distribución anatómica de las placas seniles y la acumulación de NFTs (Gotz y cols., 2004). En los seres humanos, la muerte neuronal derivada de estas dos propiedades se ha localizado principalmente en la corteza prefrontal y parietal (principalmente hipocampo) (Jacobs y cols., 2012). Sin embargo, esta localización no se ha logrado en los diferentes modelos disponibles. Teniendo esto en cuenta, la disponibilidad de un modelo que pueda cubrir estas limitaciones sería sin duda muy apreciado. En los últimos años, un roedor originario de

Chile, el *O. degus* ha ganado prominencia como un modelo valioso para muchas enfermedades diferentes, entre ellas las relacionadas con la neurodegeneración, ya que este animal puede desarrollar de manera natural varios síntomas que se pueden vincular a un número de condiciones patológicas similares a estas dolencias. Debido a su ciclo diurno particular, se ha utilizado con frecuencia en estudios circadianos (Otalora y cols., 2010; Vivanco y cols., 2010). También es un roedor muy social, lo que explica su papel en la investigación social y neuroafectiva (Colonnello y cols., 2010). Sin embargo, en los últimos años, la participación del *O. degus* en el estudio de la neurodegeneración ha señalado a ésta como uno de los campos más prometedores en los que utilizar este roedor. El *O. degus* vive una media de hasta 7 años en cautiverio (Lee, 2004), por lo que es de por sí un modelo interesante para su uso en estudios longitudinales, incluidos los relacionados en el campo de la neuropsicobiología del envejecimiento y la EA.

6.1. Similitudes histopatológicas humano / *O. degus*

En el contexto de la hipótesis amiloidea de la EA, uno de los puntos más significativos es el papel que juega la neurodegeneración colinérgica en la aparición de los dos marcadores principales de la enfermedad: la acumulación de placas de proteína β A y la formación de NFTs (Ballard y cols., 2011; Schliebs y Arendt, 2011). Sin embargo, la relación entre estos dos elementos no está clara, aunque varias hipótesis han tratado de vincularlos (Selkoe, 2001b; Masters and Selkoe, 2012). Respecto a la acumulación de β A y NFTs, hace unos años, Inestrosa y colaboradores (2005) demostraron que el *O. degus* desarrolla naturalmente acumulación de β A y NFTs con la edad (Inestrosa y cols., 2005). El descubrimiento demostró que este roedor, en su entorno natural, podría producir placas en diferentes áreas del SNC, incluyendo el hipocampo y la corteza frontal, ambos afectados en pacientes con EA (van Groen y cols., 2011; Ardiles y cols., 2012). Además, los análisis inmunohistoquímicos y genéticos realizados en el roedor, revelaron un alto grado de similitud entre los depósitos encontrados en

humanos y la APP; de hasta un 97,5% de homogeneidad según los resultados obtenidos mediante RT-PCR (Inestrosa y cols., 2005). Sin embargo, a pesar de lo prometedor que este animal puede parecer, ha de satisfacer ciertos requisitos antes de que pueda ser utilizado como un modelo apropiado para el estudio de la EA, ya que los cambios histopatológicos que ocurren en los cerebros de *O. degus* sólo se observan en los animales añosos (Inestrosa y cols., 2005; van Groen y cols., 2011) y nunca se han detectado en animales jóvenes. Comentarios similares se pueden hacer en relación con los depósitos de proteína tau. Esto sugiere que los depósitos de β A y NFTs en estos roedores son dependientes de la edad, del mismo modo que lo son tanto en pacientes con EA (Masters y Selkoe, 2012) como en algunos de los ratones transgénicos más exitosos estudiados hasta la fecha (Oddo y cols., 2003; Hock y Lamb, 2011). En relación al sistema colinérgico, el *O. degus* también cuenta con ciertas ventajas. Al parecer, el *O. degus* posee en su corteza neuronas ricas en acetilcolinesterasa (Inestrosa y cols., 2005), y aunque en densidad diferente, presentan una morfología y una localización similar a la de los humanos (Inestrosa y cols., 2005; Braidy y cols., 2012).

6.2. *Octodon degus*, ¿qué ofrece?

El éxito y bondad de un modelo animal es proporcional a su capacidad de reproducir la fisiopatología y la conducta del trastorno que se pretende estudiar. En el deterioro cognitivo asociado a la edad, el declive en la memoria es el principal aspecto que cualquier modelo que pretenda erigirse como válido para la investigación debería ser capaz de reproducir. En este sentido, un estudio reciente ha demostrado que en *O. degus* de 12 a 36 meses de edad, la acumulación progresiva de oligómeros de β A y de NFTs asociadas a la edad, correlacionan negativamente con el rendimiento en la memoria de reconocimiento espacial y de objeto (Ardiles y cols., 2012). Además, los resultados de este trabajo también muestran una correlación entre deterioro cognitivo causado por la presencia de β A y una alteración de la función y plasticidad post-sináptica (Ardiles y cols., 2012).

Como el deterioro de la memoria es la primera manifestación de los síntomas de la EA, uno de los requisitos que debe cumplir el *O. degus* es ser capaz de discriminar en diferentes tests cognitivos, diferentes tipos de memoria clásicamente afectadas en la EA. Cabe destacar que Ardiles y colaboradores (2012) utilizaron dos paradigmas conductuales para la evaluación de la memoria: el Novel Object Recognition task (NOR) y el laberinto en forma de T (T-Maze). El NOR es uno de los paradigmas escogidos para la evaluación de la memoria en esta tesis, y se detalla en la sección de «Materiales y métodos». Por su parte, el T-Maze es un test cognitivo-conductual clásicamente utilizado en conducta en modelos de aprendizaje y memoria (Sharma y cols., 2010), por lo que comparte muchas de las características, tanto teóricas como prácticas, de los otros dos paradigmas utilizados en esta tesis: el laberinto de brazo radial (Radial Arm Maze) y el laberinto de Barnes (Sharma y cols., 2010).

OBJETIVOS E HIPÓTESIS

El presente proyecto de tesis abarca los siguientes objetivos.

1. Investigar el efecto de la privación de sueño inducida mediante *gente-handling* en un modelo animal de *O. degus* joven (entre 12 y 18 meses de edad), mediante la evaluación del aprendizaje, la memoria espacial y la memoria de trabajo con los paradigmas conductuales de Radial Arm Maze, Barnes Maze y Novel Object Recognition.
2. Estudiar el efecto sumatorio de la edad y la privación de sueño inducida por *gente-handling*, mediante la evaluación del aprendizaje, la memoria espacial y la memoria de trabajo con los paradigmas conductuales de Radial Arm Maze, Barnes Maze y Novel Object Recognition.
3. Explorar el efecto de la memantina sobre el deterioro cognitivo inducido por privación de sueño. mediante la evaluación del aprendizaje, la memoria espacial y la memoria de trabajo con los paradigmas conductuales de Radial Arm Maze, Barnes Maze y Novel Object Recognition
4. Explorar si existe una posible relación entre la edad y los niveles de corticosterona, conocido marcador del estrés, y el grado de ejecución conductual en los distintos paradigmas de memoria y aprendizaje. Para ello se utilizará la técnica de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA).
5. Explorar mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) la contribución de cada diferentes neurotransmisores implicados en los procesos de memoria, aprendizaje y regulación del sueño, en el contexto del envejecimiento y el deterioro cognitivo asociado a la edad en un potencial modelo roedor para la EA.

Teniendo en cuenta lo anterior, se plantean las distintas hipótesis a explorar mediante los experimentos realizados.

1. El efecto de la privación de sueño sobre la memoria de trabajo y de referencia, medida mediante distintos paradigmas conductuales, será mayor en los animales añosos en comparación con los animales jóvenes.
2. Es presumible que la memantina revierte los efectos negativos de la privación de sueño, tanto en los *O. degus* jóvenes como en los añosos.
3. Se espera encontrar una correlación positiva entre los niveles de cortisol y la edad, así como diferencias en estos niveles entre las condiciones de sueño normal y privación de sueño.
4. Se espera encontrar una diferencia en los niveles de los neurotransmisores en los diferentes grupos de edad, así como en las diferentes estructuras analizadas: corteza frontal, hipocampo y epíffisis.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Animales

Para los experimentos llevados a cabo en este trabajo, se utilizaron 65 *Octodon degus* hembras de edades comprendidas entre los 6 y los 50 meses de edad (Tabla 1), facilitadas por el Animalario de la Universidad de Alicante. Los animales fueron transportados y estabulados individualmente en cajas estándar de plexiglás (40x25x25 cm). El suelo de las cajas se recubrió con viruta, renovada una vez por semana para mantener condiciones de higiene óptimas. En periodos de no experimentación, los animales disponían de agua y comida *ad libitum*, proporcionada por Harlan (Harlan Tekland Global Diet®, laboratorios Harlan, España). La sala de estabulación se mantuvo a una temperatura constante de $21 \pm 1^\circ\text{C}$, con ciclos de luz/oscuridad de 12 horas (inicio del ciclo de luz a las 8 a.m.). Todos los procedimientos experimentales realizados en este trabajo han cumplido con la normativa europea respecto al cuidado de animales de experimentación (2010/63/UE) y ha contado con la aprobación del comité científico y ético de la Universidad de Murcia.

Edad (meses)	Estudios conductuales	HPLC	ELISA
6	-	5	5
12	16	5	5
24	-	-	5
> 36	14	5	5

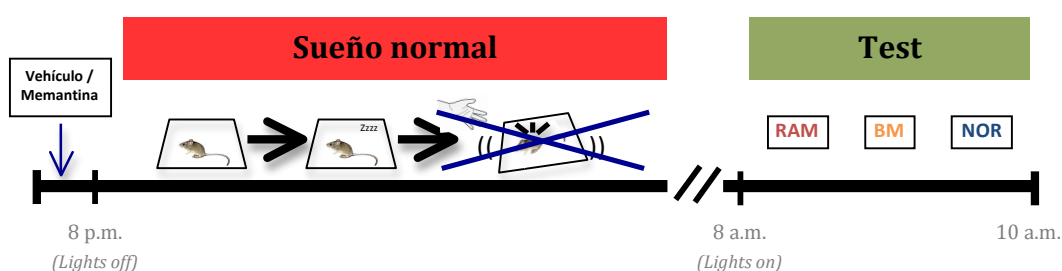
Tabla 1. Matriz de animales utilizados en los diferentes experimentos.

2. Diseño experimental

2.1. Experimentos conductuales

Todos los experimentos de evaluación conductual se llevaron a cabo entre las 8 a.m. y las 10 a.m. Previo a la realización de los test, los animales estaban sometidos a una de dos condiciones: sueño normal (No SD), en la que se les dejaba descansar toda la noche en su ciclo normal de sueño/vigilia; y privación de sueño (SD), en la que se alteraba su ciclo de descanso, impidiéndoles dormir. Transcurridas las 12 horas del periodo de oscuridad, se comenzaba la batería de pruebas. Para los estudios farmacológicos, la memantina se obtuvo a través de Sigma-Aldrich (Madrid, España) y se almacenó a temperatura ambiente. En la condición de tratamiento, una dosis de 0 (suero salino 0.9% v/v) o 10 mg/Kg se administró intraperitonealmente a los animales 15 minutos antes del inicio del ciclo de oscuridad. Así, los grupos experimentales utilizados en este fueron cuatro: No SD sin tratamiento (control), No SD con tratamiento, SD sin tratamiento y SD con tratamiento.

a) Condición de sueño normal (No SD)



b) Condición de privación de sueño (SD)

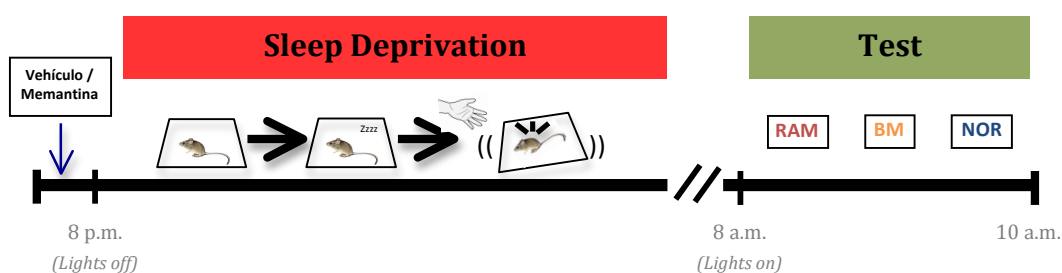


Fig. 8. Esquema de los programas seguidos para los estudios conductuales. Antes de realizar la batería de test, los animales pasaban por una de estas dos condiciones diferenciadas: condición de sueño normal (a), o privación de sueño (b).

2.2. Extracción de sangre para medición de cortisol

La extracción de sangre para la medición de los niveles de corticosterona plasmática se realizó tres veces al día, siguiendo el procedimiento explicado más adelante. Las horas de extracción de sangre fueron las 7:30 a.m., 1:00 p.m. y 7:30 p.m. La elección de estos tiempos se realizó acorde a datos extraídos de la literatura, en los que se describen valores diferenciados en las horas previas a los distintos ciclos de actividad circadiana (Lilley y cols. 2011).

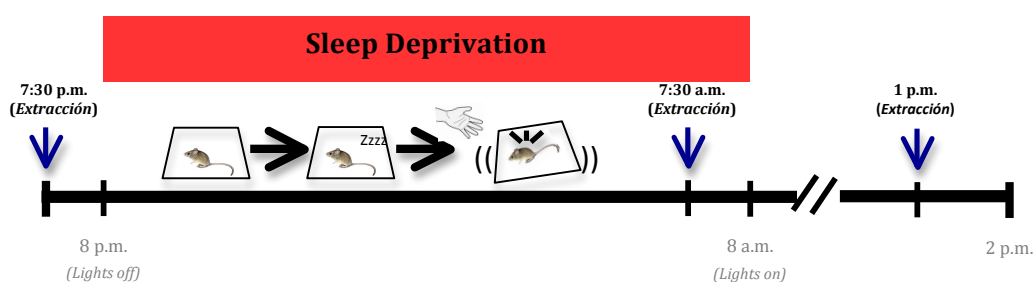


Fig. 9. Esquema del programa seguido para la extracción de sangre para el análisis de corticosterona en plasma.

3. Procedimientos

3.1. Privación de sueño

La privación de sueño (SD) por *gentle handling* es un procedimiento por el cual el ciclo de sueño normal del animal es interrumpido mediante una leve, aunque suficiente, estimulación táctil en el momento en que el animal comienza a presentar signos de adormecimiento, bien electrofisiológicos, bien posturales. Para ello, se utilizó una adaptación del método descrito previamente por Tobler y cols (1997). En el momento en que el animal presentaba signos de adormecimiento (más de un minuto de inactividad), se balanceaban suavemente las cajas de estabulación, hasta lograr que el animal comenzara a deambular. El procedimiento daba comienzo al inicio de la fase de descanso (las 8 p.m.), y tenía una duración de 12 horas, hasta completar el total del ciclo de oscuridad. A las 8 a.m. comenzaba el ciclo diurno. Para evitar que

los animales se durmieran durante el periodo entre el final del ciclo de noche y el comienzo de los test, se mantenía la estimulación hasta el inicio de las pruebas conductuales.

3.2. Radial Arm Maze

El laberinto consiste en ocho brazos de metacrilato opaco de 57x11 cm que se coloca radialmente alrededor de una plataforma central (Foreman y Ermakova, 1998), situada a 40 cm del suelo. Para evitar que el animal escape de un brazo a otro sin pasar por la plataforma central, se añadieron paredes de poliuretano (17x15 cm) a ambos lados de cada brazo (Unidad Técnica de la Universidad de Murcia).

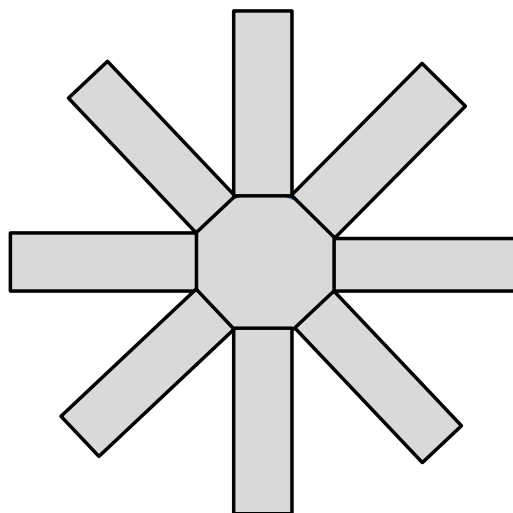


Fig. 10. Esquema del Radial Arm Maze, visto desde arriba.

Fase de habituación

En esta fase, todos los animales fueron sometidos a una sesión de aclimatación al entorno (Fig. 11). En esta sesión, los animales eran trasladados desde la colonia a la sala de experimentación, donde permanecían sin manipular durante 5-10 minutos. Después, cada animal era colocado en el centro de la plataforma y se le permitía explorar el laberinto libremente durante 15 minutos. Transcurrido este tiempo, era introducido en su caja y devuelto a la colonia.

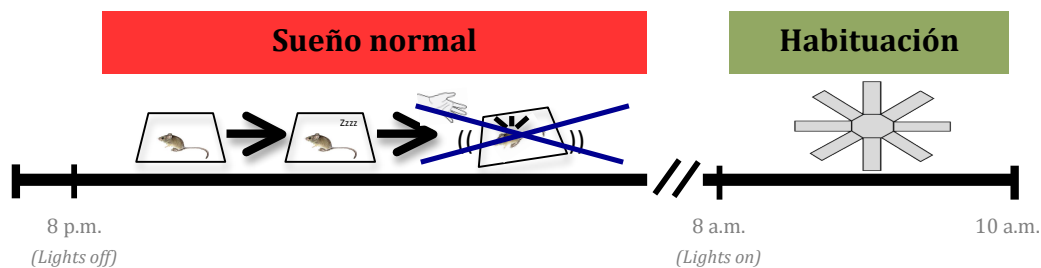


Fig. 11. Esquema de la fase de habituación en el Radial Arma Maze. Los animales pasaron por esta fase durante 3 días consecutivos, antes de comenzar la fase de entrenamiento.

Fase de entrenamiento

Una semana previa al comienzo del entrenamiento, los animales fueron sometidos a un programa de restricción de la ingesta con el fin de poder utilizar posteriormente su propia comida como reforzador. La fase de entrenamiento consistió en una sesión diaria durante siete días consecutivos (Fig. 12). Durante este periodo, se introdujeron cuatro porciones de comida en cuatro brazos distintos, escogidos de forma aleatoria.

En el entrenamiento, los animales eran situados en el centro de la plataforma, retenidos durante treinta segundos. Finalizado este tiempo, se permitía al animal explorar el laberinto hasta: a) un máximo de 10 minutos; b) los ocho brazos eran visitados; c) pasara 2 minutos desde la última visita a uno de los brazos. Aquí, un brazo se considera «visitado» cuando el cuerpo completo del animal está dentro del brazo (excluyendo la cola). Terminado el ensayo, el animal era devuelto a su caja y la superficie limpiada con etanol al 70%, con el fin de evitar claves odoríficas para el resto de animales.

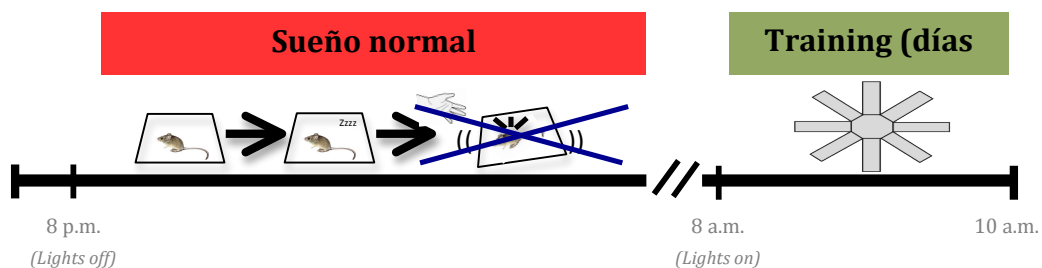


Fig. 12. Esquema de la fase de entrenamiento en el Radial Arma Maze. Los animales pasaron por esta fase durante 7 días consecutivos.

Fase de test

Como medida de memoria y aprendizaje se calculó la diferencia entre el último y el primer día de entrenamiento. Para el análisis se tuvieron en consideración cuatro variables: a) la latencia de entrada en el primer brazo; b) el tiempo total en completar el ensayo de entrenamiento; c) el número de errores de memoria de referencia (entrar en un brazo que no tuviera reforzador); y d) el número de errores de memoria de trabajo (entrar en un brazo previamente visitado en esa sesión). Para el efecto de la privación de sueño, se compararon la ejecuciones del primer día y el día después de la privación (Fig. 13).

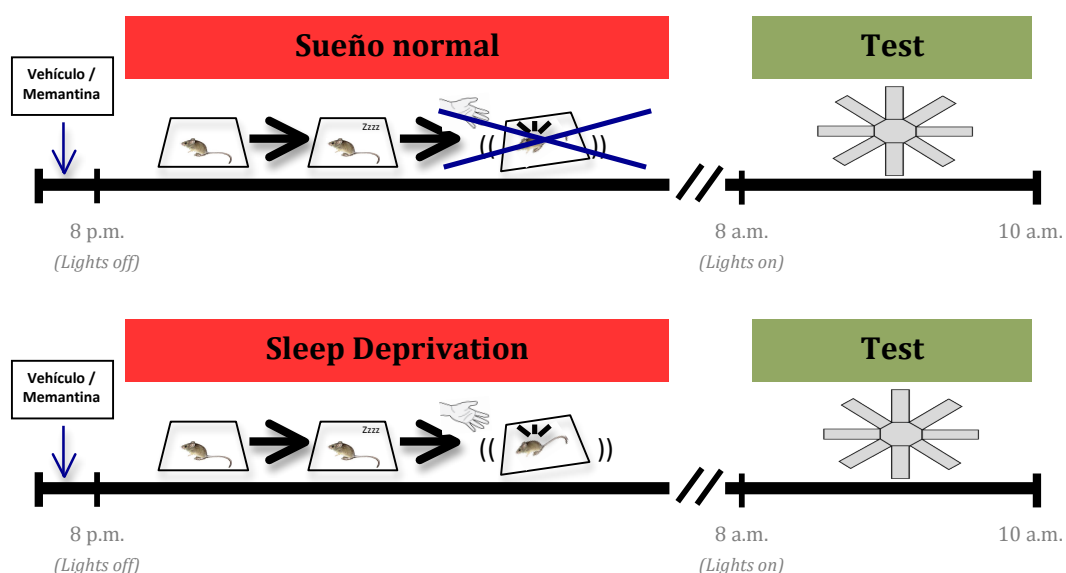


Fig. 13. Esquema de la fase de test en el Radial Arm Maze. Después de pasar por una de las dos condiciones de sueño, los animales eran expuestos a una última sesión, cuya ejecución fue registrada y comparada entre ambas.

Todos los ensayos se realizaron entre una y dos horas después de finalizar el ciclo de oscuridad.

3.3. Barnes Maze

El laberinto de Barnes (Barnes, 1979) es una plataforma circular de plexiglás blanco opaco (160 cm diámetro), elevada a 45 cm del suelo y rodeada por una pared de polietileno de

50 cm de altura. La plataforma cuenta con dieciocho agujeros circulares (8 cm diámetro), separados por una distancia equidistante de 16 cm y 5.5 cm separados del borde. Todos los agujeros están bloqueados en la parte inferior por una malla metálica, a excepción del «agujero de escape». La posición del agujero de escape no varía a lo largo de las sesiones. La caja de estabulación del animal («caja de escape») se coloca debajo del agujero de escape (Fig. 14).

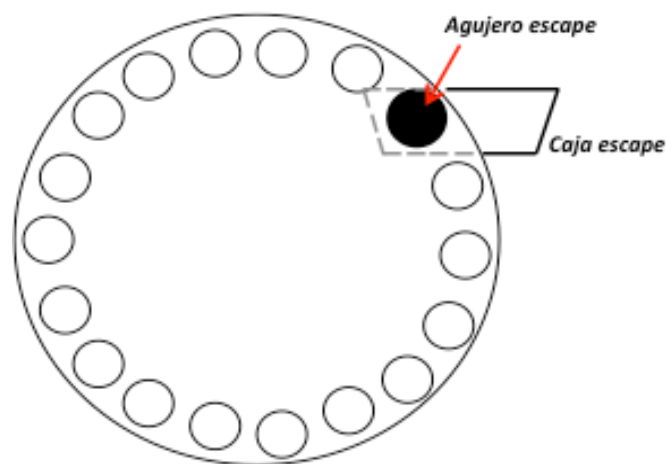


Fig. 14. Esquema del Barnes Maze, visto desde arriba.

El procedimiento se divide en tres partes diferenciadas.

Fase de habituación

La primera fase comienza con el animal en la caja de escape durante dos minutos. Finalizado este tiempo, se le coloca cerca del agujero de escape y se deja que explore durante un minuto. Si en ese tiempo no logra escapar, se dirige manualmente su escape hasta que logra introducirse en el agujero. La plataforma se limpia entonces con alcohol al 70%. Dos minutos después de permanecer en la caja de escape, se coloca al animal durante 30 segundos en un compartimento abierto en sus extremos (35x10 cm), situado en el centro de la plataforma. Pasado este tiempo, se permite al animal explorar la plataforma libremente hasta un máximo de cuatro minutos. Si el animal no escapa en ese periodo, se dirige manualmente su escape hasta

que entra en el agujero, donde permanece en la caja de escape durante dos minutos. La plataforma se limpia de nuevo. Transcurridos los dos minutos, se devuelve al animal al estabulario con el resto de la colonia (Fig. 15).

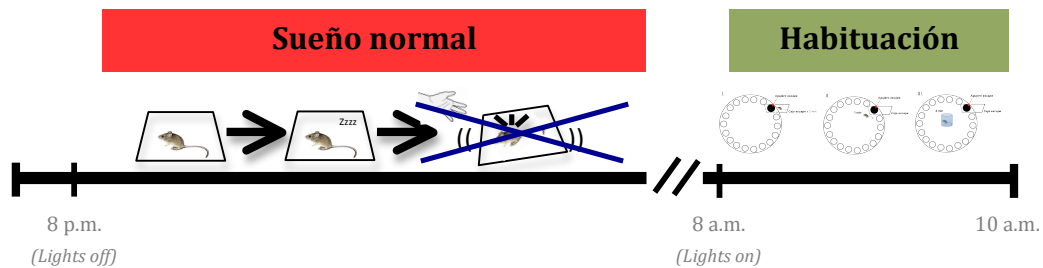


Fig. 15. Esquema de la fase de habituación en el Barnes Maze. Los animales pasaron por esta fase un día previo al comienzo del entrenamiento.

Fase de entrenamiento

En esta fase se coloca al animal en el centro de la plataforma dentro del compartimento de restricción durante 30 segundos. Tras este tiempo, se retira el compartimento y el animal es libre de explorar el laberinto hasta un máximo de cuatro minutos. Si el animal no escapa en ese tiempo, se dirige manualmente su escape hasta que entra en el agujero, donde permanece en la caja de escape durante dos minutos. La plataforma se limpia entonces con alcohol al 70%. Este procedimiento se repite cuatro veces antes de devolver al animal a la colonia, y se repite durante siete días consecutivos (Fig. 16).

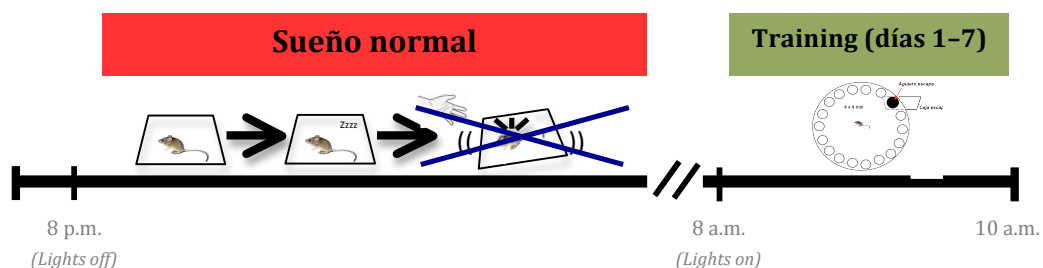


Fig. 16. Esquema de la fase de entrenamiento en el Barnes Maze. Los animales pasaron por esta fase durante 7 días consecutivos. Al finalizar, se dejó una semana de descanso antes de la sesión de test.

Fase de test

La fase de test se realiza 7 días después de la última sesión de entrenamiento, y consiste en una sesión de entrenamiento similar a las ocurridas anteriormente. Las variables que se han tenido en cuenta para el análisis son cuatro: a) la latencia de llegada al agujero de escape; b) el tiempo total en completar un ensayo; c) el número total de errores de memoria de escape (visitar un agujero que no es el agujero de escape) en los cuatro ensayos; y d) el número total de errores de memoria de trabajo (visitar un agujero previamente visitado en ese ensayo) en los cuatro ensayos. Para el efecto de la privación de sueño, se comparó la ejecución el día de test y la ejecución el día después de la privación (Fig. 17).

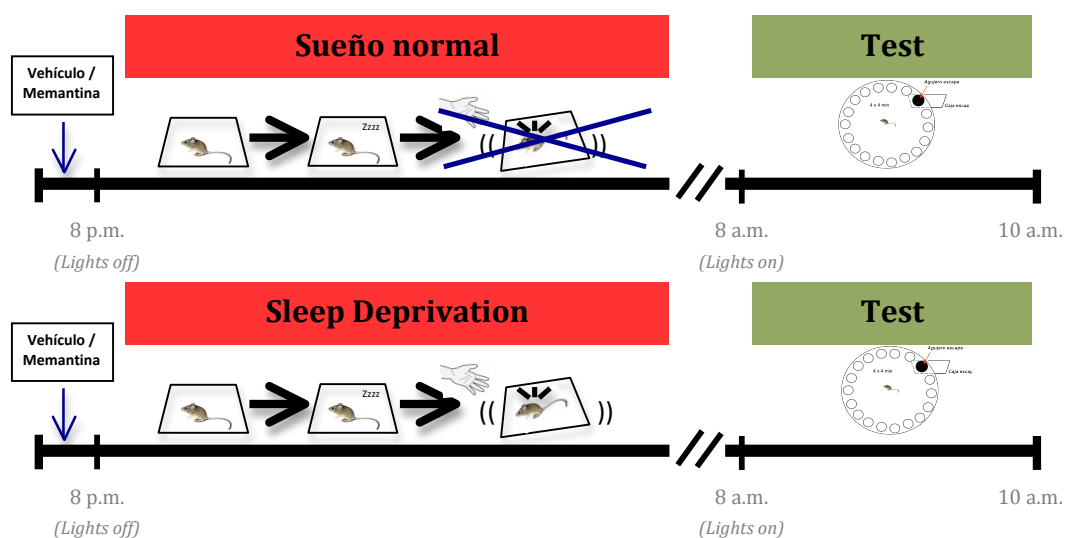


Fig. 17. Esquema de la fase de test en el Barnes Maze. Después de pasar por una de las dos condiciones de sueño, los animales eran expuestos a una última sesión, siete días después del último ensayo de entrenamiento. La ejecución fue registrada y comparada entre ambas condiciones.

Para facilitar la orientación de los animales, se colocaron diferentes claves visuales fijas en las paredes de la sala en que se llevaron a cabo las distintas fases. Todos los ensayos se realizaron entre una y dos horas después de finalizar el ciclo de oscuridad.

3.4. Novel Object Recognition

El protocolo de Novel Object Recognition (Ennaceur, 2010) utilizado en este trabajo permite realizar un examen doble: el reconocimiento de lugar y el reconocimiento de objeto, por otra. Con el fin de que se acostumbraran al entorno, se trasladó previamente a los animales a la habitación en que tendría lugar el test, donde permanecieron 10 minutos sin ser molestados (Fig. 18).

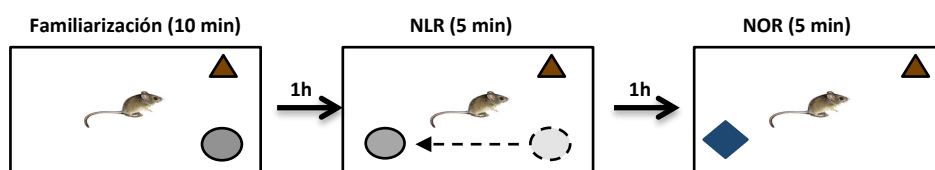


Fig. 18. Esquema del Novel Object Recognition. El mismo día, los animales pasaban por los tres ensayos distintos, separados cada uno por un periodo de una hora.

Fase de familiarización

Para cada animal, se introdujeron dos objetos diferentes en lados opuestos de la caja para que los exploraran libremente durante un periodo de 5 minutos. Transcurrido este tiempo, se retiraron los objetos y se limpiaron con etanol al 70%.

Reconocimiento de lugar (Novel Local Recognition; NLR)

Una hora después, se introdujeron los mismos dos objetos de la *Fase de habituación* cambiando la situación de uno de ellos a la esquina contraria, y se dejó un periodo de 5 minutos para que exploraran libremente. Tras este tiempo, se retiraron los objetos de la caja y se limpiaron con etanol al 70%.

Reconocimiento de objeto (Novel Object Recognition; NOR)

Una hora después del NLR, se introdujeron dos objetos en la caja de cada animal: uno familiar y un objeto nuevo. El objeto familiar era el mismo que se había utilizado en el ensayo de habituación, y que no había cambiado su posición en el test de reconocimiento de lugar. Se

permitió al animal explorar los objetos durante 5 minutos. Tras este tiempo, se retiraron los objetos y se devolvió a los animales a la colonia.

El test al grupo sometido a privación de sueño se realizó 7 días después que al grupo en condiciones de sueño normales (Fig. 19).

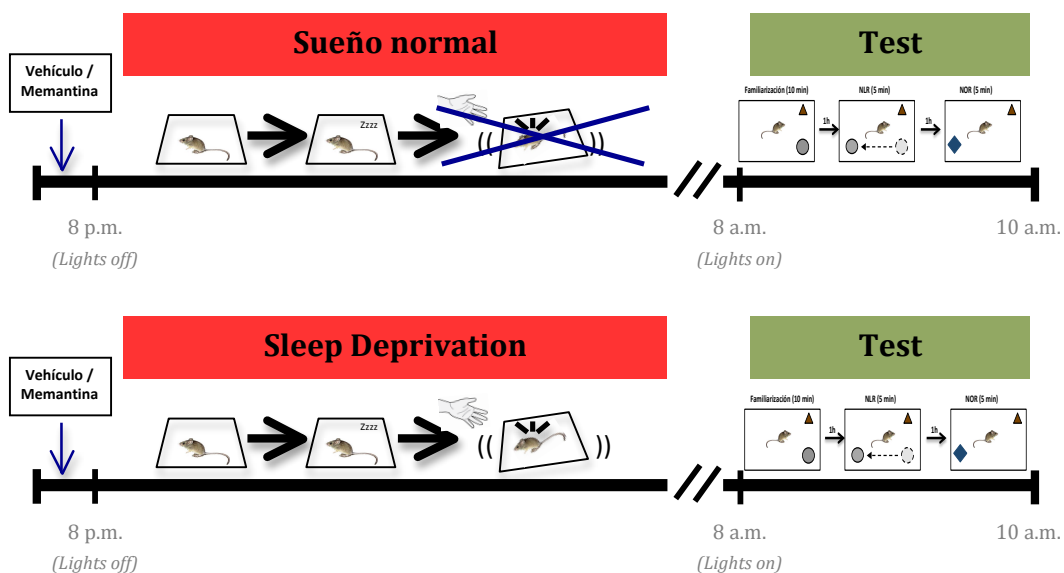


Fig. 19. Esquema de la fase de test en el Novel Object Recognition. Después de pasar por una de las dos condiciones de sueño, los animales eran expuestos a tres sesiones, una fase de familiarización, una de reconocimiento de lugar y otra de reconocimiento de objeto. La ejecución fue registrada y comparada entre ambas condiciones.

La variable utilizada para el análisis fue el tiempo de exploración de los objetos, medido en segundos. Todos los ensayos se realizaron entre una y dos horas después de finalizar el ciclo de oscuridad.

3.5. HPLC

Sacrificio de los animales y obtención de las muestras

Para la obtención de muestras, los animales fueron anestesiados con isoflurano (IsobaVet®, París) por vía inhalatoria de forma continua con un vaporizador MSS3 (Medical Supplies & Services, Inglaterra, UK), en un rango de 3 mg/L/min para la inducción y de 1.5 mg/L/min para el mantenimiento. Una vez anestesiados, se procedió a la decapitación y

extracción del cerebro. El hemisferio derecho, elegido para llevar a cabo los análisis bioquímicos, fue congelado mediante carbógeno, e inmediatamente guardado en un congelador a -80°C , hasta el momento del procesado.

Tratamiento de las muestras

Las áreas seleccionadas para el análisis fueron: corteza frontal, hipocampo y epitálamo (Fig. 20).

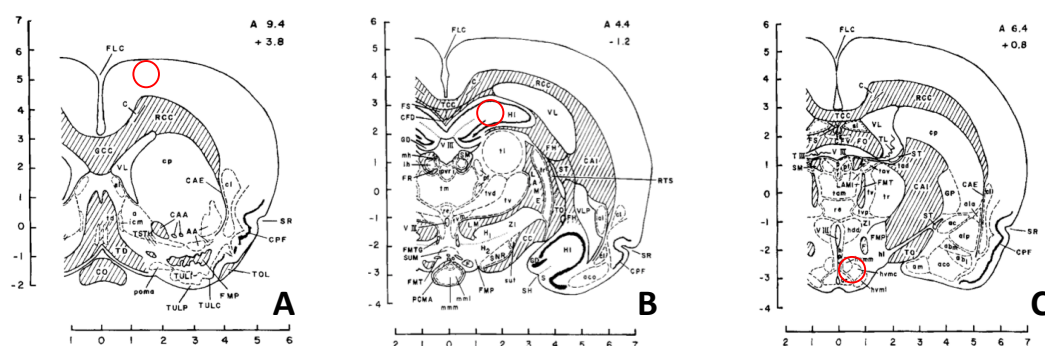


Fig. 20. Secciones escogidas para el análisis por HPLC. A) Corteza frontal (sección a nivel de la decusación del quiasma óptico), B) hipocampo (sección anterior al inicio de los cuerpos mamilares), y C) epitálamo (sección a nivel de visión del haz mamilotalámico). Imagen obtenida de Wright y Ken, 1992.

De cada estructura, se homogenizaron $50\ \mu\text{g}$ de tejido extraído mediante un sistema de *punching* (Panlab-Harvard apparatus, Barcelona, España) durante un minuto en $0.8\ \text{ml}$ de tampón de fosfato $0.1\ \text{M}$ ($\text{pH}\ 5$). Durante el proceso las muestra fueron mantenidas en hielo. El homogenado de las secciones se centrifugó a $9000\ \text{rpm}$ durante cuatro minutos, a una temperatura de $4\ ^{\circ}\text{C}$. Al finalizar el centrifugado, se extrajo el sobrenadante, se introdujo en un eppendorf a través de un filtro de $12\ \text{K}$ (Whatman, Maidstone, UK) de corte y se procedió a un segundo centrifugado durante 10 minutos a $9000\ \text{rpm}$, a una temperatura de $4\ ^{\circ}\text{C}$.

Soluciones y reactivos

Los estándares de 5HT, DA, melatonina, Glut y ACh fueron suministradas por Sigma (Sigma-Aldrich, Madrid, España), con un grado de pureza HPLC. El stock se preparó a concentraciones de $250\ \text{mg/L}$ en ácido fórmico, siendo almacenado a -20°C hasta su utilización.

Estas condiciones garantizan la estabilidad de los patrones el tiempo necesario hasta llevar a cabo los análisis. Los estándares de trabajo se prepararon el mismo día del análisis a partir del stock de estándar.

Procedimiento de derivatización

Las muestras para inyección se obtuvieron añadiendo 15 μ l de solución estándar por cada 15 μ l de solución derivada, colocados en un vial de 0,5 ml (Pierce, Illinois, EE.UU.). El vial se selló, se calentó durante 20 minutos a 50 °C y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se inyectaron 20 μ l de la solución de reactivo en el cromatógrafo. Previamente, para la calibración, se utilizó agua MiliQ (Millipore, Massachusetts, EE.UU.) en lugar de solución de reactivo.

Sistema de Cromatografía

El sistema lo formaban un cromatógrafo líquido Agilent 1100 (Agilent Technologies España, S.L., Madrid, España) compuesto por un automuestreador (hasta 91 muestras), un degasificador y una doble bomba binaria. El cromatógrafo se conectó a un detector de Diode-Array y un sistema de espectrometría de masas de trampa iónica en un rango de 50–2200. El sistema contaba también con fuentes de Electrospray y APCI para ionización positiva y negativa. Se utilizó una columna de sílice C18 (4.6 x 150 mm) (Mircobore) y 5 μ m de tamaño de partícula (Tosoh, Tokio, Japón), junto con un guarda columna Develosil ODS UG-S (10 x 1.0 mm). La columna se programó para un flujo de 0.7 ml/min, una presión máxima de 400 bar y una temperatura de 25° C en un horno para columna termostaticada L-2350 (15 – 100° C) (Interlink Scientific Services Limited, UK).

La separación de los analitos se realizó mediante una fase móvil de metanol (eluyente A) y ácido fórmico 0,05% (v/v) en agua, con ácido heptafluorobutírico a una concentración 1mM (eluyente B). Se programó un flujo de 0,2 ml/min en un rango de presión creciente de 20 a 35 MPa mediante un inyector automático. Se utilizó un perfil de gradiente, partiendo de un 95% de eluyente B y manteniendo una composición constante durante 30 segundos hasta aproximarse a

un 0% en 3 minutos y medio. Esta composición se mantuvo durante un minuto antes de volver a las condiciones iniciales, previo periodo de recalibración de dos minutos. En el ensayo, el lavado de columna se realizó aplicando acetonitrilo a un ritmo de 50 μ l/h durante una hora al final de la sesión de medición.

3.6. ELISA

La cuantificación de corticosterona en plasma se realizó mediante un análisis por ELISA.

Obtención y tratamiento de las muestras

Para la extracción de sangre, los animales fueron previamente anestesiados con isoflurano (Isoba® vet, North Augusta, EE.UU.) y administrado por vía inhalatoria de forma continua con un vaporizador MSS3 (Medical Supplies & Services, Inglaterra, RU). Treinta minutos después de poner en marcha la máquina, los animales fueron trasladados a la sala de procedimientos. En el procedimiento, el animal es introducido en una cámara de plexiglás (23x13x13 cm) en la que se dispensa el isoflurano en un rango de 3 mg/L y se mantiene a un ritmo de 1.5 mg/L. Una vez el animal está dormido, se coloca cuidadosamente en la tabla de cirugía. Para continuar con la anestesia durante la extracción, se coloca en la tabla un dispositivo de inhalación que permite la estabilidad de la cabeza del animal y mantiene el flujo del anestésico.

Una vez colocado, se rasura el pelo de las patas del animal. La vena safena lateral del *O. degus* transcurre de manera dorsal, hasta aparecer lateralmente a la altura del tarso. Utilizando una aguja para insulina (0.5x16 mm), colocada directamente sobre la vena en un ángulo de 30°, se extrajeron entre 100 y 200 μ l, recogidos con tubos capilares heparinizados (Microvette® CB 300, Sarsted, Alemania). Debido a la rápida coagulación que presentan estos animales, para facilitar el paso de la sangre se ejerció una leve presión y flexión de la pata en aquellos casos que fue necesario. Una vez recogido el volumen necesario, se colocó un algodón sobre la punción y se mantuvo hasta que cesó la salida de sangre. Tras esto, se inyectó

subcutáneamente suero salino al animal y se esperó a que se recuperara parcialmente de la anestesia, antes de introducirlo de nuevo en su caja de estabulación.

La sangre recogida fue mantenida en hielo en el periodo de tránsito entre la extracción y su procesamiento. Una vez allí, se centrifugó durante 10 minutos a 4° C, a una velocidad de 3600 rpm. Tras el centrifugado, entre 60 y 120 µl de sobrenadante se guardaron en eppendorfs de 1,5 ml, congelados inmediatamente a -80° C hasta su utilización. La cuantificación de los niveles de corticosterona en plasma se realizó mediante el Kit EIA de Cortisol (*Enzo Life Science*, Lausen, Suiza) siguiendo las indicaciones de procedimiento del fabricante.

Curva patrón

Las muestras estándar de cortisol fueron diluidas en tampón de ensayo para establecer la curva patrón (Tabla 2). Tras esto, se añadió a las muestras el reactivo de desplazamiento de esteroides, en una proporción reactivo/muestra de 1:99.

Std.	Assay Buffer Vol. (µL)	Vol. Added (µL)	Cortisol Conc. (pg/mL)
1	900	100, Stock	10,000
2	500	500, Std. 1	5,000
3	500	500, Std. 2	2,500
4	500	500, Std. 3	1,250
5	500	500, Std. 4	625
6	500	500, Std. 5	313
7	500	500, Std. 6	156

Tabla 2. Matriz de concentraciones de estándar de cortisol para la realización de la curva patrón.

Ensayo ELISA

Una vez confeccionada la curva patrón, se añadió a una cantidad de estándar de cortisol una muestra piloto para determinar la eficacia de la extracción. En un segundo momento, se añadió 1 ml de dietiléter por cada ml de muestra, seguido de tampón de stop, y se agitó la

preparación. Después, una vez las distintas capas se diferenciaron, se pipeteó cuidadosamente la capa de éter y se colocó en un tubo de ensayo limpio. Estos pasos se repitieron dos veces más, a fin de tener las muestras por triplicado. Para evitar la degradación de la muestra, el éter remanente se evaporó bajo una atmósfera inerte. Tras este paso, se extrajo el cortisol, se reconstituyeron las muestras con el tampón de ensayo, se agitaron los pocillos unos pocos segundos y se dejó asentar la mezcla durante cinco minutos a temperatura ambiente. Tras repetir este último paso dos veces, las muestras reconstituidas se congelaron a -20° C hasta el momento de su uso.

4. Análisis estadístico

El efecto del entrenamiento sobre la latencia, el tiempo total y los errores de memoria de referencia y de memoria de trabajo cometidos en el Radial Arm Maze (RAM) fueron analizados con una prueba t de Student para muestras relacionadas. Se realizó un ANOVA de uno (Condición), dos (Edad x Condición) y tres (Dosis x Edad x Condición) factores, en el caso apropiado, para analizar el efecto de la privación de sueño en esas mismas variables en los distintos grupos de edad y distintos tratamientos.

El análisis de las variables latencia, tiempo total, errores de memoria de referencia y errores de memoria de trabajo en el Barnes Maze (BM) durante la fase de entrenamiento se realizó mediante una prueba t de Student para muestras relacionadas. Para evaluar el efecto de la privación de sueño, en las variables latencia y tiempo total se realizó un ANOVA de dos factores de medidas repetidas Condición (No SD vs. SD) x Ensayo. Para la evaluación del efecto sumatorio de la memantina, la edad y la condición, se realizó un ANOVA de dos factores: Edad (Jóvenes vs. Viejos) x Condición, o tres factores: Dosis (Vehículo vs. Memantina) x Edad x Condición, en los casos apropiados, sobre la media del tiempo en los cuatro ensayos del test.

Los errores de memoria de referencia y memoria de trabajo se evaluaron con un ANOVA de dos (Edad x Condición) o tres (Dosis x Edad x Condición) factores sobre cada tipo de error.

Para analizar los resultados del NOR se realizó un ANOVA de dos (Condición x Objeto) o tres (Dosis x Edad x Condición) factores sobre el índice de reconocimiento extraído a partir del tiempo total de exploración de los distintos objetos.

Los resultados de los niveles de corticosterona plasmática analizaron calculando la media de la absorbancia para cada estándar y muestra, y restando la media de absorbancia óptica de la unión en la muestra a la media de la absorbancia óptica de la unión inespecífica. Los valores resultantes se analizaron con un ANOVA de dos factores (Edad x Condición).

Los resultados de HPLC se analizaron comparando los valores de las muestras y los de los estándares mediante un ANOVA de dos factores. Los valores están expresados en «Área (*ppm*)», o partes por millón de neurotransmisor encontradas en la muestra y expresada como un valor de área.

Para todos los análisis, se consideró un nivel de confianza del 95%, calificando los resultados como significativos o muy significativos cuando $p < 0.05$ y $p < 0.01$, respectivamente. Los valores en las figuras están expresados como la media \pm s.e.m.

RESULTADOS

1. Efecto de la privación de sueño en el *O. degus*

1.1. Efecto de la privación de sueño sobre la memoria y el aprendizaje espacial en *O. degus* joven medido con el paradigma de Radial Arm Maze

Para el análisis del Radial Arm Maze se tuvieron en cuenta cuatro variables. El análisis de la latencia de entrada al primer brazo (medida en segundos) durante los días de entrenamiento mostró diferencias significativas entre los tres primeros días y el resto de sesiones de entrenamiento ($p < 0.05$; $p < 0.01$) (Fig. 21A). El efecto del entrenamiento sobre el tiempo total requerido para finalizar el ensayo también reveló diferencias significativas desde el tercer al último día de entrenamiento ($p < 0.01$), en comparación con los dos ensayos anteriores. No existieron diferencias entre el tiempo para finalizar la sesión de entrenamiento durante los tres primeros días (Fig. 21B).

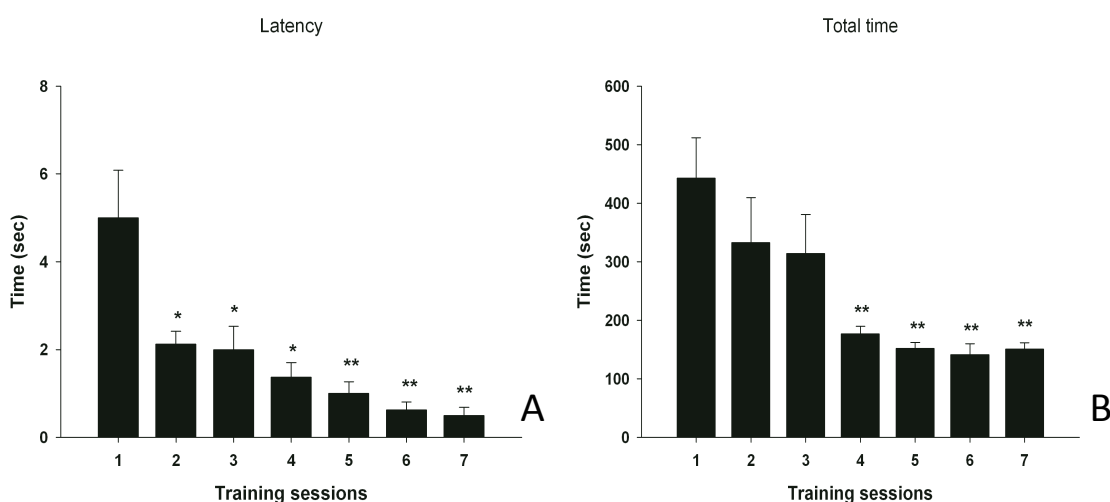


Fig. 21. Efecto del entrenamiento en latencia y tiempo total en *O. degus* jóvenes en el RAM. A) Latencia de entrada en un brazo (segundos), y B) Tiempo total de duración del test (segundos) durante las sesiones de entrenamiento ($n = 16$), * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, respecto al día 1 de exposición.

Acercas de los errores de memoria de referencia (Fig. 21C) y memoria de trabajo (Fig. 21D), el examen estadístico también expuso diferencias significativas en ambas variables a lo largo del entrenamiento. Concretamente, el número de errores de referencia disminuyó de forma significativa a partir del cuarto ensayo ($p < 0.01$), en comparaciones con los días anteriores.

Asimismo, también los errores en la memoria de trabajo fueron significativamente inferiores en los días tres ($p < 0.05$), cuatro ($p < 0.01$), cinco ($p < 0.01$), seis ($p < 0.01$) y siete ($p < 0.01$), en comparación con las dos primeras exposiciones, las cuales no presentaron diferencias entre sí.

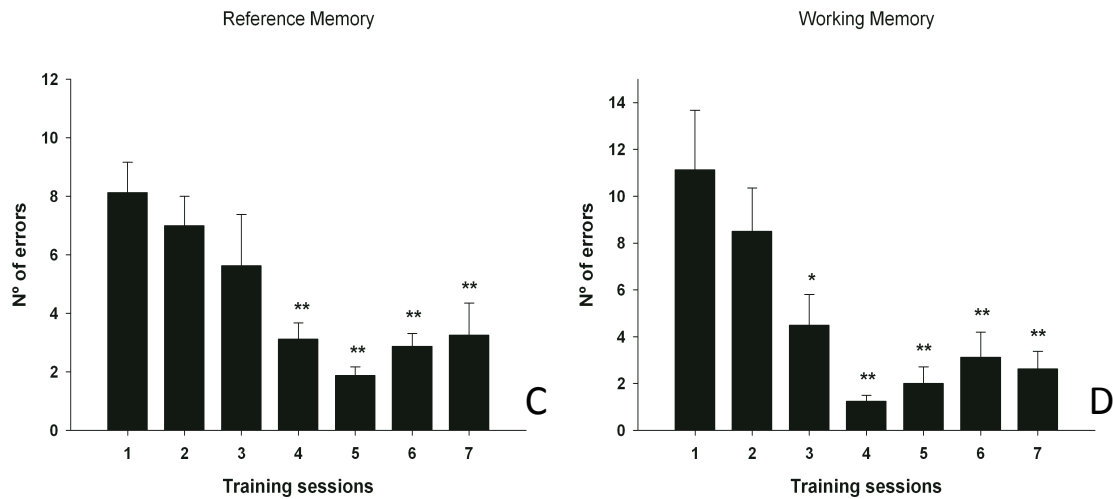


Fig. 21. Efecto del entrenamiento sobre los errores de memoria en *O. degus* jóvenes en el RAM. C) Número de errores de memoria de referencia, y D) Número de errores de memoria de trabajo durante las sesiones de entrenamiento ($n = 16$), * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, respecto al día 1 de exposición.

El efecto de la privación de sueño sobre las cuatro variables reveló un efecto de la Condición (SD vs. No SD) [$F(1, 12) = 17.047$; $p < 0.01$]. Una prueba post hoc (Tukey) mostró que existían diferencias significativas entre el grupo privado de sueño (SD) y el grupo no privado de sueño (No SD), tanto en latencia ($p < 0.01$) (Fig. 22A), como en tiempo total ($p < 0.05$) (Fig. 22B) y en el número de errores de memoria de referencia ($p < 0.01$) (Fig. 22C) y de memoria de trabajo ($p < 0.01$) (Fig. 22D).

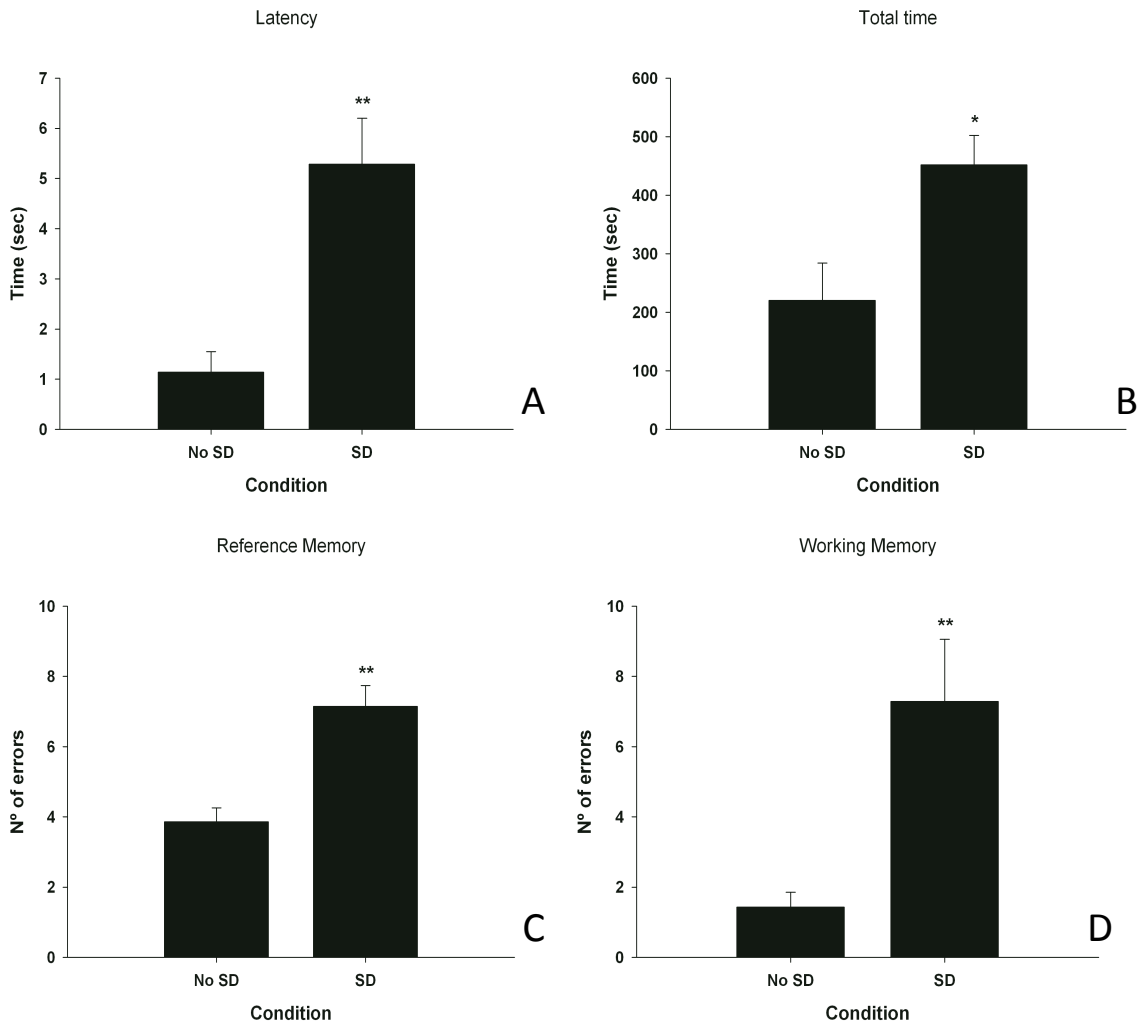


Fig. 22. Efecto de la privación de sueño en *O. degus* jóvenes en el RAM. A) Latencia de entrada en un brazo (segundos), B) Tiempo total de duración (segundos), C) Número de errores de memoria de referencia, y D) Número de errores de memoria de trabajo durante la sesión de test (n = 16). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, respecto al control.

1.2. Efecto de la privación de sueño sobre la memoria y el aprendizaje espacial en *O. degus* joven medido con el paradigma de Barnes Maze

En el laberinto de Barnes, cuatro variables fueron consideradas para el análisis: la latencia de escape (medida en segundos), el tiempo total en terminar cada ensayo (medida en segundos), el número de errores de memoria de referencia y el número de errores de memoria de trabajo. El análisis mostró un efecto significativo del entrenamiento sobre la latencia de escape y el tiempo total para completar el ensayo. Concretamente, la latencia de escape se redujo significativamente a partir del segundo día de exposición al laberinto ($p < 0.01$) (Fig. 23A). Por su parte, el tiempo

para completar el ensayo se vio significativamente reducido en el segundo ensayo ($p < 0.01$), y de forma menos significativa igualmente en los ensayos tres, cuatro, cinco y seis ($p < 0.05$). No Se encontró diferencia entre el primer día y séptimo (Fig. 23B).

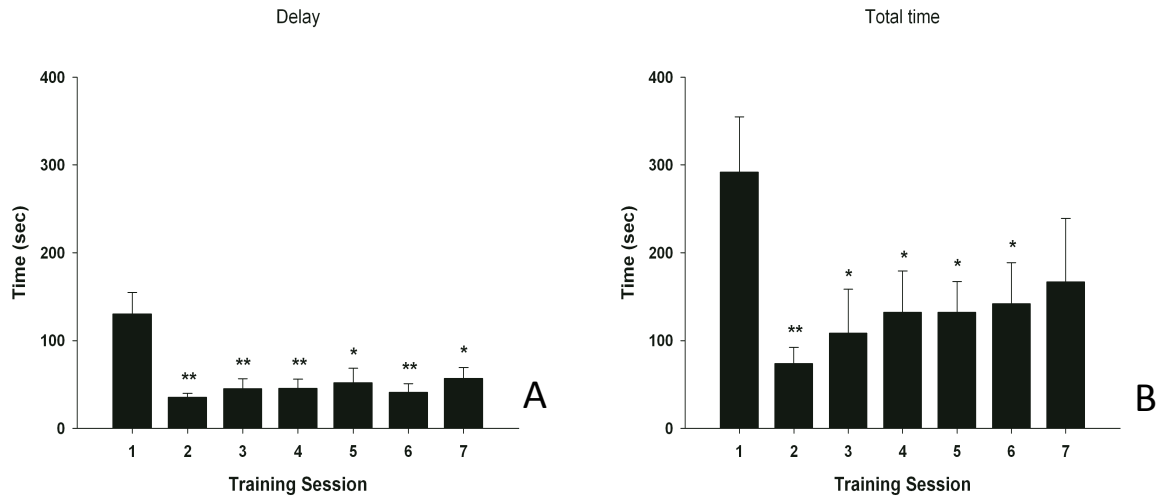


Fig. 23. Efecto del entrenamiento en latencia y tiempo total en *O. degus* jóvenes en el BM. A) Latencia de entrada en el agujero de escape (segundos), y B) Tiempo total de duración (segundos) durante las sesiones de entrenamiento (media de los cuatro ensayos de una sesión) ($n = 16$), * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, respecto al día 1 de exposición.

La prueba t para muestras relacionadas mostró diferencias significativas en el número total de errores de memoria de referencia y memoria de trabajo cometidos durante las sesiones de entrenamiento. Los animales cometieron menos errores de referencia los días tercero ($p < 0.05$), cuarto ($p < 0.05$), quinto ($p < 0.01$), sexto ($p < 0.01$) y séptimo ($p < 0.05$), en comparación con el primer y segundo día (Fig. 23C). Respecto a los errores de memoria de trabajo, las diferencias se encuentran desde el segundo día ($p < 0.05$; $p < 0.01$) (Fig. 23D).

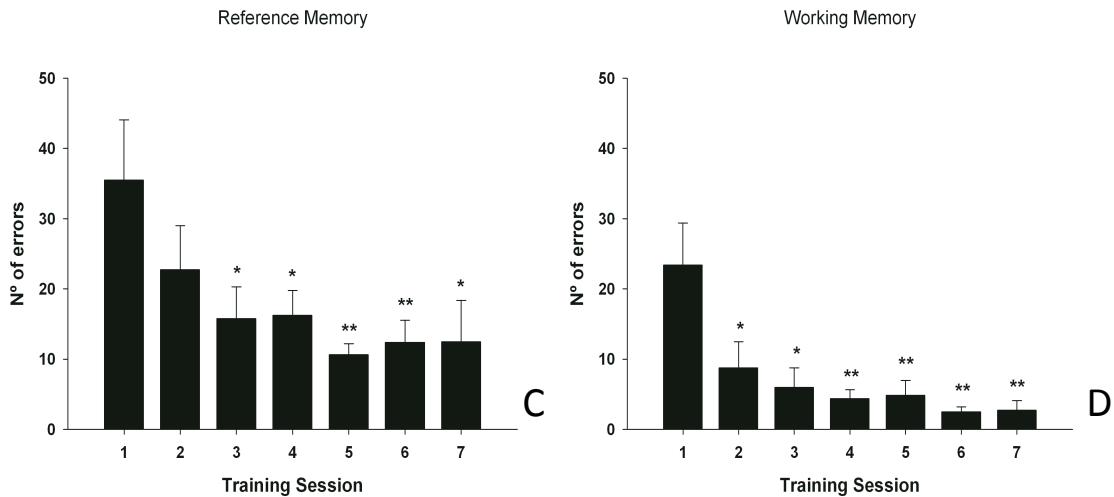


Fig 23. Efecto del entrenamiento sobre los errores de memoria en *O. degus* jóvenes en el BM. C) Número de errores de memoria de referencia, y D) Número de errores de memoria de trabajo durante las sesiones de entrenamiento (n = 16), * p < 0.05; ** p < 0.01, respecto al día 1 de exposición.

Para determinar el efecto de la privación de sueño sobre la latencia al agujero de escape y el tiempo total en completar el ensayo, se realizó un análisis ANOVA de dos factores con medidas repetidas. El análisis estadístico mostró un efecto significativo de la condición en el aumento del tiempo total [F (1, 9) = 55.355; p < 0.01] (Fig. 24A) y de la latencia [F (1, 12) = 5.75; p < 0.05] (Fig. 24B).

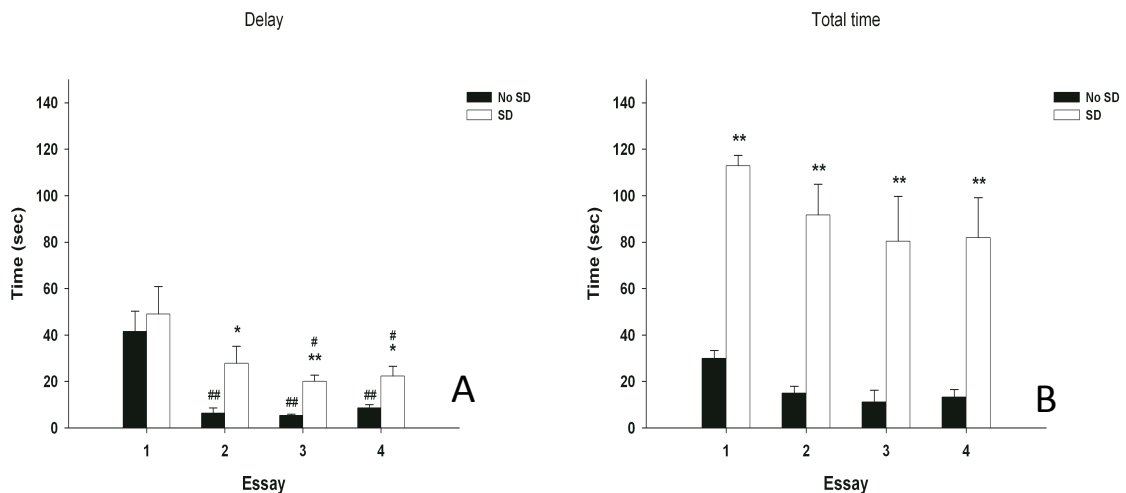


Fig. 24. Efecto de la privación de sueño sobre la latencia y el tiempo total en *O. degus* jóvenes en el BM. A) Latencia de entrada en el agujero de escape (segundos), y B) Tiempo total de duración (segundos) durante los cuatro ensayos de la sesión de test (n = 16). * p < 0.05; ** p < 0.01, respecto al grupo No SD; # p < 0.05, respecto del ensayo 1 de la sesión.

No se encontraron interacciones entre las variables. Se realizó un ANOVA sobre la condición para evaluar el efecto de la privación de sueño sobre el número total de errores de

referencia y errores de memoria de trabajo cometidos. El análisis mostró un efecto significativo de la condición para ambos, tanto para los errores de referencia [F (1, 12) = 17.071; $p < 0.01$] como para los errores de memoria de trabajo [F (1, 12) = 13.241; $p < 0.01$] (Fig. 24C).

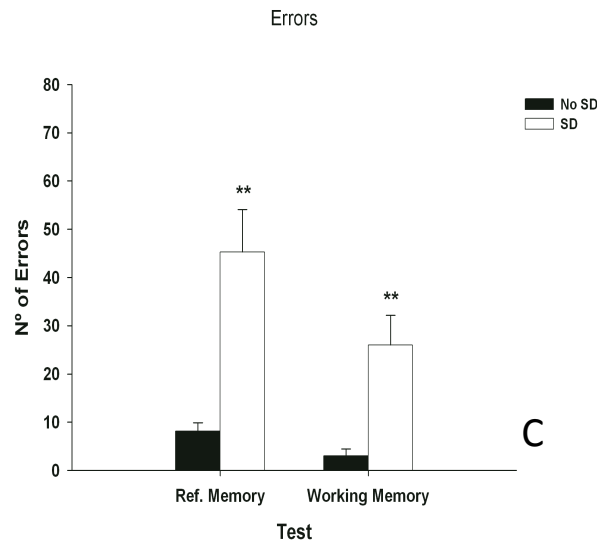


Fig. 24. Efecto de la privación de sueño sobre el número de errores de memoria en *O. degus* jóvenes en el BM. C) Número de errores de memoria de referencia y de memoria de trabajo (media de los cuatro ensayos) en la sesión de test (n = 16), ** $p < 0.01$, respecto al grupo No SD.

1.3. Efecto de la privación de sueño sobre la memoria y el aprendizaje espacial en *O. degus* joven medido con el paradigma de Novel Object Recognition

Para evaluar el tiempo invertido en cada objeto durante los ensayos de familiarización, NLR y NOR se llevó a cabo un ANOVA de dos factores (Objeto x Condición) . El análisis no mostró diferencias significativas en el tiempo de exploración durante el ensayo de familiarización en ninguna de las dos condiciones (Fig. 25A).

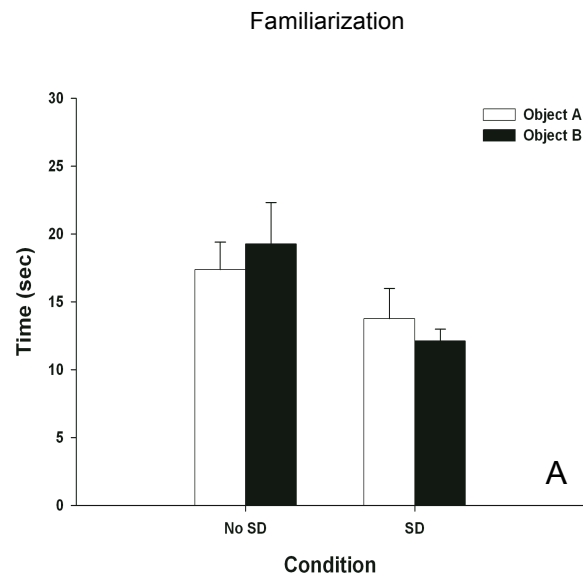


Fig. 25. Efecto de la privación de sueño sobre el reconocimiento de objeto en *O. degus* jóvenes. A) Tiempo de exploración (segundos) del Objeto A y del Objeto B por los grupos No SD y SD durante el ensayo de familiarización (n =16).

El efecto de la privación de sueño sobre la memoria de reconocimiento de lugar y reconocimiento de objeto se realizó mediante un ANOVA de dos factores de medidas repetidas (Condición x Objeto). El análisis mostró un efecto significativo de la Condición [$F(1,36) = 7.239$; $p < 0.05$] y del Objeto [$F(2,36) = 10.503$; $p < 0.01$]. También se halló interacción entre los factores [$F(2,36) = 11.583$; $p < 0.01$]. Una prueba de Tukey posterior no halló diferencias en el ensayo de familiarización, pero sí reveló diferencias significativas entre el objeto 2 respecto al objeto familiar, tanto en el test de NLR ($p < 0.01$) (Fig. 25B), como en el test de NOR ($p < 0.01$) (Fig. 25C), en el grupo No SD. El grupo con SD no mostró diferencias en el tiempo de exploración en ninguno de los tres ensayos del test: familiarización, NLR y NOR.

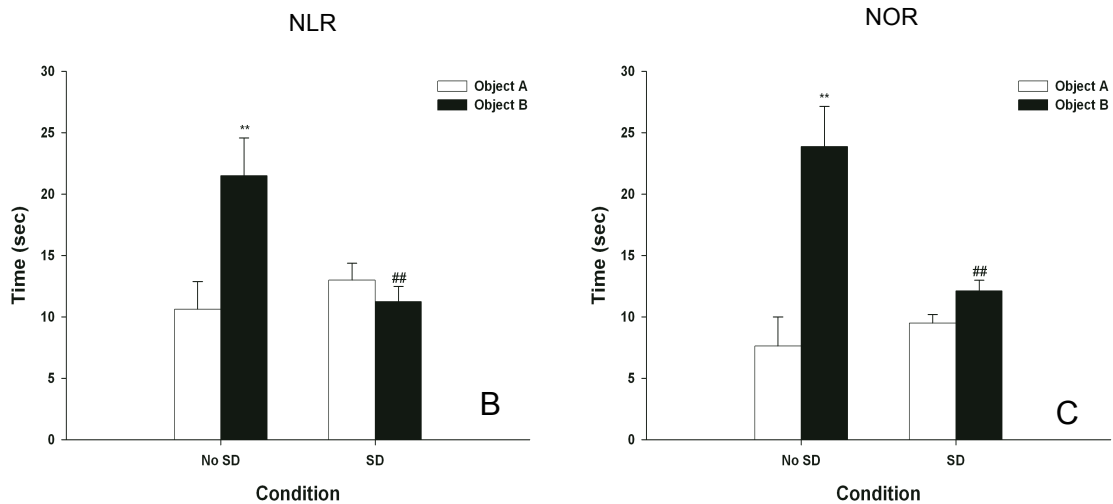


Fig. 25. Efecto de la privación de sueño sobre el reconocimiento de objeto en *O. degus* jóvenes. B) Tiempo de exploración (segundos) del Objeto A y del Objeto B por los grupos No SD y SD durante el ensayo de reconocimiento de lugar (NLR); ** $p < 0.01$ respecto al Objeto A; # $p < 0.05$ significativo respecto al grupo sin privación de sueño (No SD) ($n = 16$). C) Tiempo de exploración (segundos) del Objeto A y del Objeto B por los grupos No SD y SD durante el ensayo de reconocimiento de objeto (NOR); ** $p < 0.01$, respecto al Objeto A; # $p < 0.05$, respecto al grupo No SD ($n = 16$).

1.4. Efecto de la privación de sueño sobre la memoria y el aprendizaje espacial en *O. degus* añosas medido con el paradigma de Radial Arm Maze

Con el objetivo de comprobar el efecto de la edad en el deterioro cognitivo, se aplicaron los mismos tests de conducta a las *O. degus* de mayor edad. El test estadístico mostró diferencias significativas a partir de la segunda sesión y hasta la última ($p < 0.01$), en comparación con la primera exposición (Fig. 26A). El tiempo de las sesiones segunda, tercera, cuarta, quinta, sexta y séptima no resultó significativamente diferente. Asimismo, se encontraron diferencias significativas en las sesiones quinta ($p < 0.05$), sexta ($p < 0.01$) y séptima ($p < 0.01$) del tiempo total para completar la tarea. No se hallaron diferencias significativas entre las cuatro primeras sesiones (Fig. 26B).

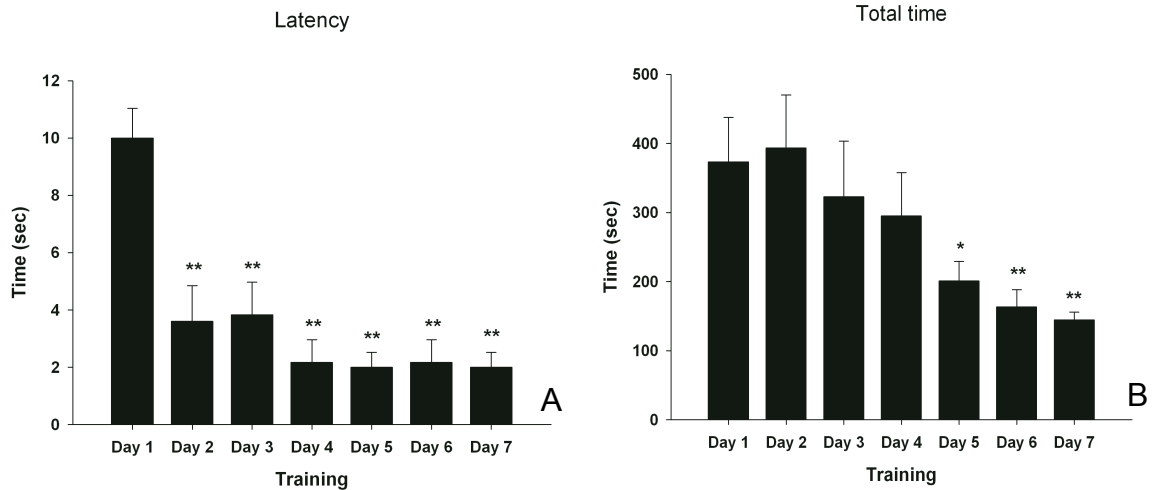


Fig. 26. Efecto del entrenamiento en latencia y tiempo total en *O. degus* añosas en el RAM. A) Latencia de entrada en un brazo (segundos), y B) Tiempo total de duración del test (segundos) durante las sesiones de entrenamiento (n = 14), * p < 0.05; ** p < 0.01, respecto al día 1 de exposición.

El análisis de los errores durante la fase de entrenamiento mostró una reducción significativa en los errores de memoria de referencia cometidos en las sesiones tres ($p < 0.05$), cuatro ($p < 0.01$), cinco ($p < 0.01$), seis ($p < 0.05$) y siete ($p < 0.01$). No hubo diferencias entre los errores cometidos en las dos primeras sesiones (Fig. 26C). Respecto a los errores de memoria de trabajo, se encontró una reducción significativa de los errores desde la tercera a la última sesión de entrenamiento ($p < 0.01$), pero no entre las sesiones primera y segunda (Fig. 26D).

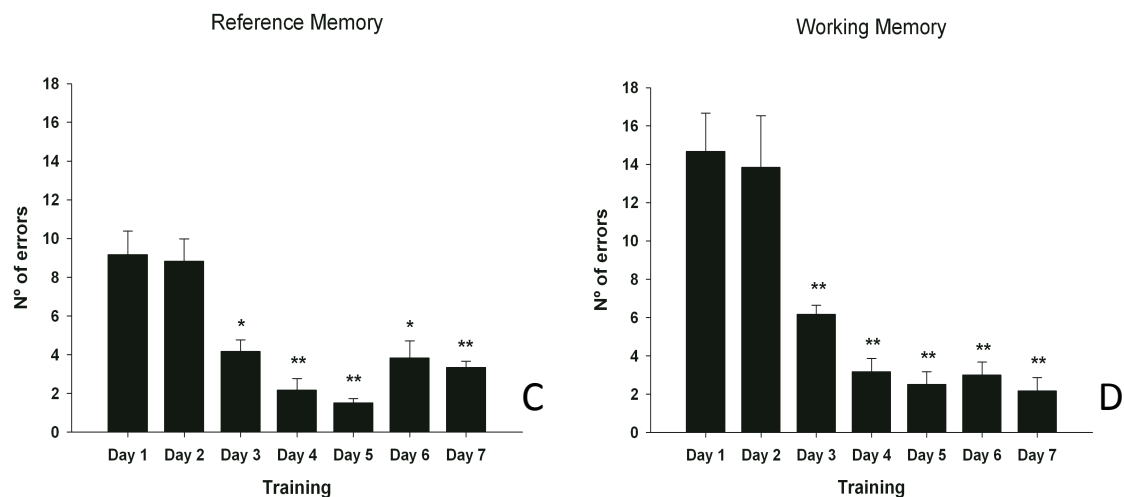


Fig. 26. Efecto del entrenamiento en errores de memoria en *O. degus* añosas en el RAM. C) Número de errores de memoria de referencia, y D) Número de errores de memoria de trabajo durante las sesiones de entrenamiento (n = 14), * p < 0.05; ** p < 0.01, respecto al día 1 de exposición.

El efecto de la privación de sueño sobre las cuatro variables reveló un efecto de la Condición (SD vs. No SD) [$F(1,10) = 45.432$; $p < 0.01$]. Un análisis post hoc posterior mostró que diferencias significativas entre los grupos con sueño normal y con privación de sueño se encontraban tanto en latencia ($p < 0.01$) (Fig. 27A) y el tiempo total ($p < 0.05$) (Fig. 27B), como en el número de errores de memoria de referencia ($p < 0.01$) (Fig. 27C) y de trabajo ($p < 0.01$) (Fig. 27D).

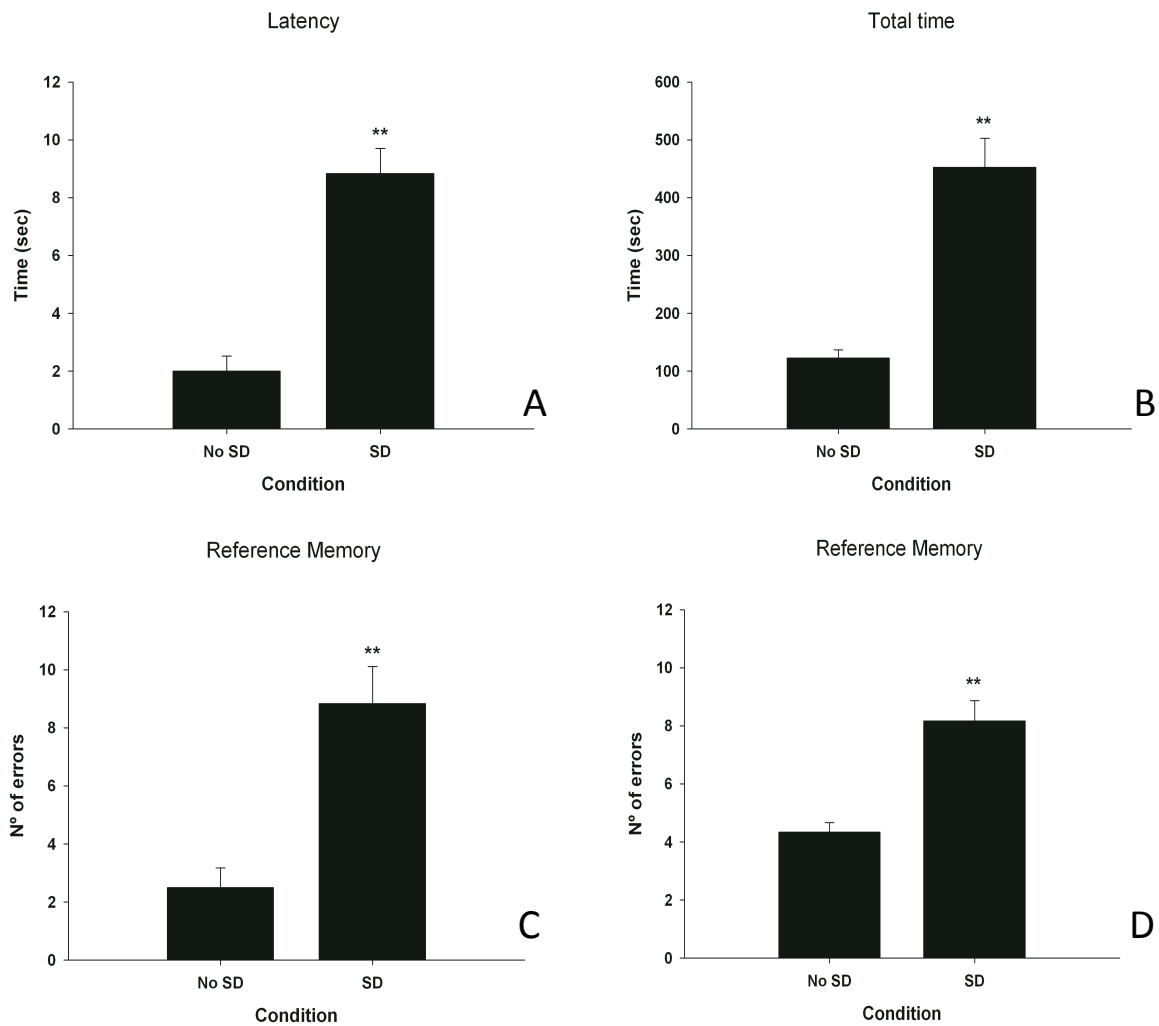


Fig. 27. Efecto de la privación de sueño en *O. degus* añosas en el BM. A) Latencia de entrada en un brazo (segundos), B) Tiempo total de duración (segundos), C) Número de errores de memoria de referencia, y D) Número de errores de memoria de trabajo durante la sesión de test ($n = 14$). ** $p < 0.01$, respecto al grupo No SD.

1.5. Efecto de la privación de sueño sobre la memoria y el aprendizaje espacial en *O. degus* viejo medido con el paradigma de Barnes Maze

El análisis del efecto del aprendizaje mostró que los animales redujeron significativamente el tiempo de latencia a partir del segundo día ($p < 0.05$, $p < 0.01$) (Fig. 28A). El análisis sobre el tiempo total para completar cada sesión reveló diferencias significativas los días dos ($p < 0.01$), tres ($p < 0.01$), cuatro ($p < 0.01$), seis ($p < 0.05$) y siete ($p < 0.05$), siendo el tiempo de estos días menor en comparación con el primer día de exposición al test (Fig. 28B).

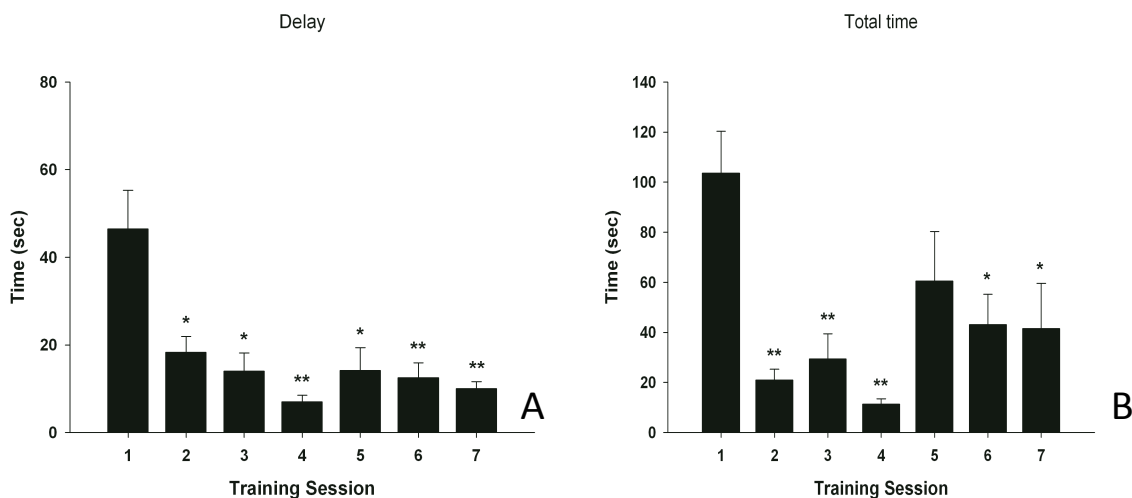


Fig. 28. Efecto del entrenamiento en latencia y tiempo total en *O. degus* añosas en el BM. A) Latencia de entrada en el agujero de escape (segundos), y B) Tiempo total de duración (segundos) durante las sesiones de entrenamiento (media de los cuatro ensayos de una sesión) ($n = 14$), * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, respecto al día 1 de exposición.

Al analizar los errores de memoria de referencia como los errores de memoria de trabajo cometidos durante los siete días de entrenamiento se observaron diferencias significativas desde la tercera sesión hasta la última, en comparación con las dos primeras sesiones ($p < 0.05$; $p < 0.01$) (Fig. 28C). Las dos primeras sesiones no fueron diferentes respecto al número de errores. El análisis de los errores de memoria de trabajo también evidenció diferencias significativas desde la segunda sesión de entrenamiento hasta la última ($p < 0.05$; $p < 0.01$) (Fig. 28D).

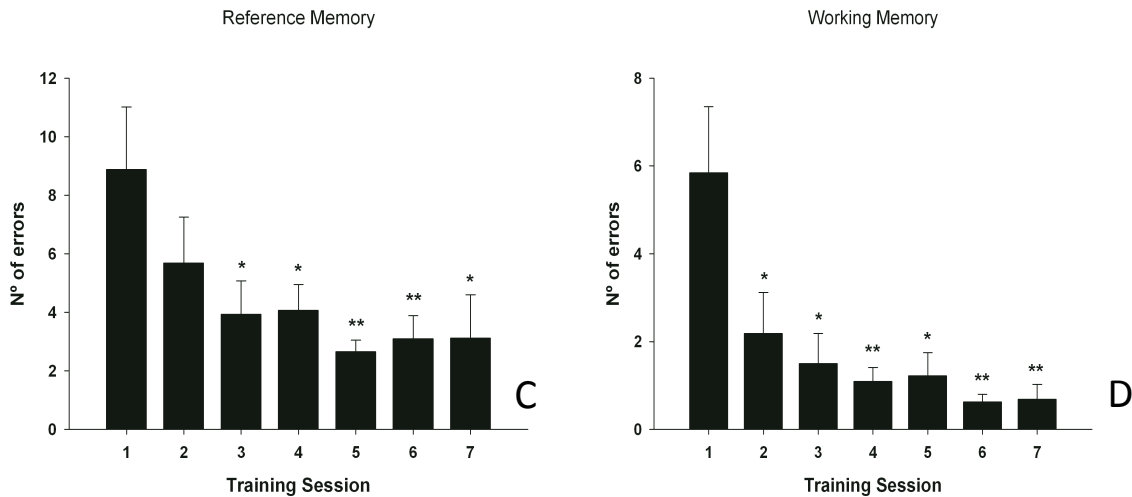


Fig. 28. Efecto del entrenamiento sobre los errores de memoria en *O. degus* añosas en el BM. C) Número de errores de memoria de referencia, y D) Número de errores de memoria de trabajo durante las sesiones de entrenamiento (n = 14), * p < 0.05; ** p < 0.01, respecto al día 1 de exposición.

El análisis del efecto de la privación de sueño sobre la latencia en las *O. degus* añosas mostró un efecto significativo del Ensayo [$F(3, 30) = 22.830$; $p < 0.01$] y la Condición [$F(1,10) = 15.687$; $p < 0.01$]. No se halló interacción entre ambos factores. Sin embargo, un análisis post hoc de los factores por separado mostró una diferencia significativa en el tiempo de latencia entre los grupos No SD y SD ($p < 0.01$), pero no en el tiempo entre los diferentes ensayos de la sesión (Fig. 29A). Para analizar el tiempo total empleado por los animales en completar cada ensayo del test, se utilizó también un ANOVA de dos factores con medidas repetidas (Ensayo x Condición). Se hallaron diferencias significativas tanto para el Ensayo [$F(3, 30) = 9.920$; $p < 0.01$] como para la Condición [$F(1,10) = 327.005$; $p < 0.01$]. Si bien tampoco se halló interacción en esta variable, un análisis post-hoc de Tukey determinó diferencias significativas entre los grupos No SD y SD ($p < 0.01$), aunque no entre el tiempo de finalización de cada ensayo de la sesión (Fig. 29B).

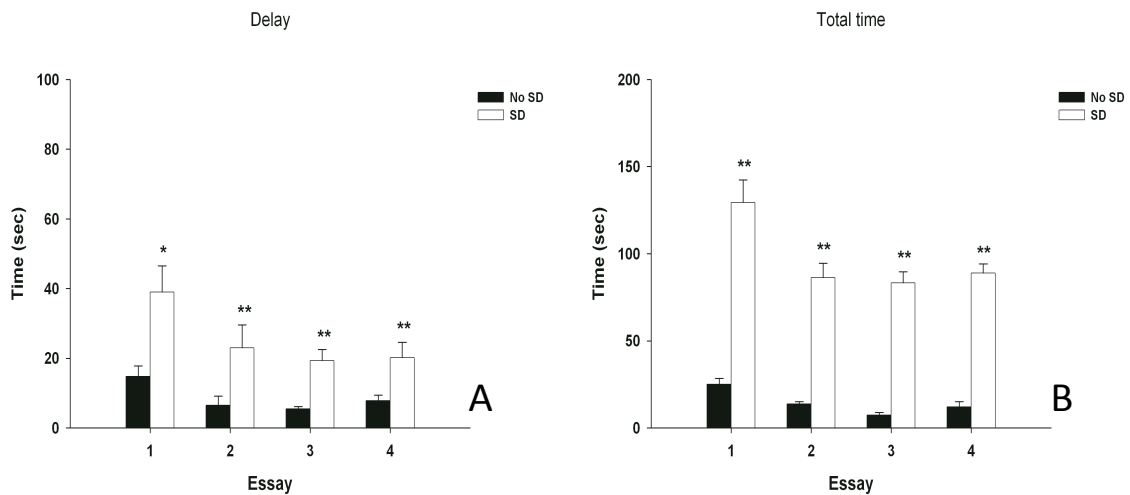


Fig. 29. Efecto de la privación de sueño sobre la latencia y el tiempo total en *O. degus* añosas en el BM. A) Latencia de entrada en el agujero de escape (segundos), y B) Tiempo total de duración (segundos) durante los cuatro ensayos de la sesión de test (n = 14). * p < 0.05; ** p < 0.01, respecto al grupo No SD; # p < 0.05, respecto del ensayo 1 de la sesión.

El análisis de los errores cometidos mostró diferencias significativas entre los grupos No SD y SD tanto para los errores de memoria de referencia [F(1,13) = 9.347; p < 0.01] como para los errores de memoria de trabajo (p < 0.01) [F(1,13) = 5.192; p < 0.01] (Fig. 29C).

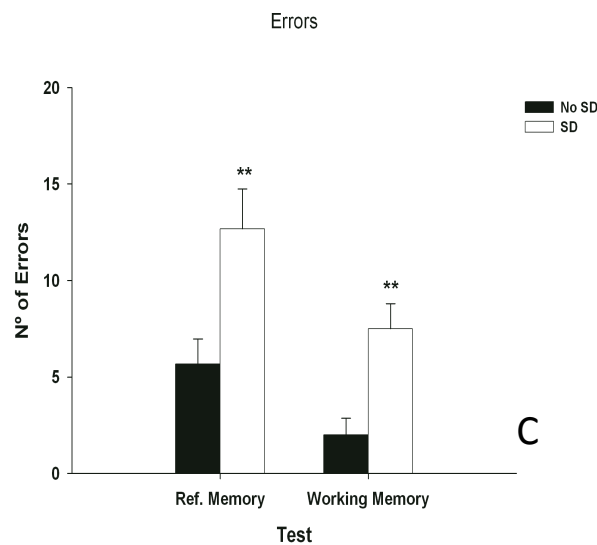


Fig. 29. Efecto de la privación de sueño sobre los errores de memoria en *O. degus* añosas en el BM. C) Número de errores de memoria de referencia y de memoria de trabajo (media de los cuatro ensayos) en la sesión de test (n = 14), ** p < 0.01, respecto al grupo No SD.

1.6. Efecto de la privación de sueño sobre la memoria y el aprendizaje espacial en *O. degus* viejo medido con el paradigma de Novel Object Recognition

El análisis del tiempo de exploración de los objetos en los ensayos de familiarización, NLR y NOR mostró un efecto significativo de la Condición [$F(1,20) = 20.691$; $p < 0.01$] y del Objeto [$F(1,20) = 4.763$; $p < 0.05$]. También se halló un efecto de la interacción [$F(1,20) = 5.892$; $p < 0.05$]. Un análisis posterior con la prueba Tukey mostró que durante la sesión de familiarización, no existían diferencias significativas en el tiempo de exploración, bajo ninguna de las dos condiciones experimentales (No SD / SD) (Fig. 30A).

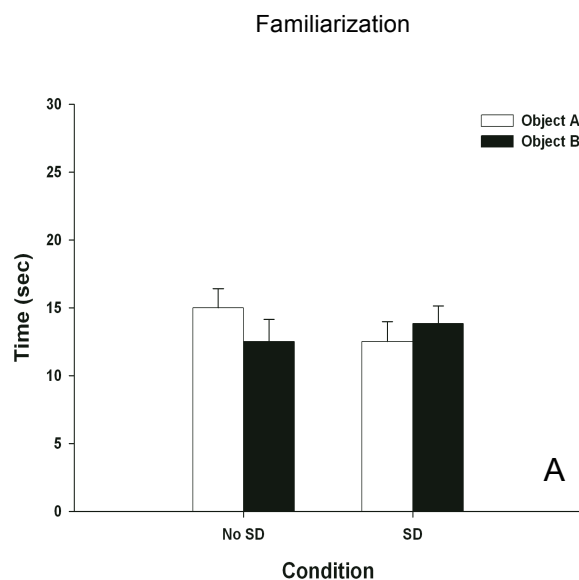


Fig. 30. Efecto de la privación de sueño sobre el reconocimiento de objeto en *O. degus* añosas. A) Tiempo de exploración (segundos) del Objeto A y del Objeto B por los grupos No SD y SD durante el ensayo de familiarización ($n = 14$)

En el análisis de la prueba de NLR sí se obtuvo una diferencia significativa en el tiempo de exploración dedicado a cada objeto en el grupo No SD, siendo mayor el de exploración el objeto 2 ($p < 0.01$). No hubo diferencias en el tiempo de exploración de los objetos en el grupo SD. Se halló igualmente entre los grupos No SD y SD en el tiempo de exploración del objeto 2 (Fig. 30B). Se obtuvo un resultado similar en el ensayo de NOR. El análisis mostró un tiempo de exploración del

objeto 2 cuantitativamente superior en el grupo No SD, pero no en el SD. También se halló una diferencia en el tiempo de exploración de este objeto entre las condiciones No SD y SD (Fig. 30C).

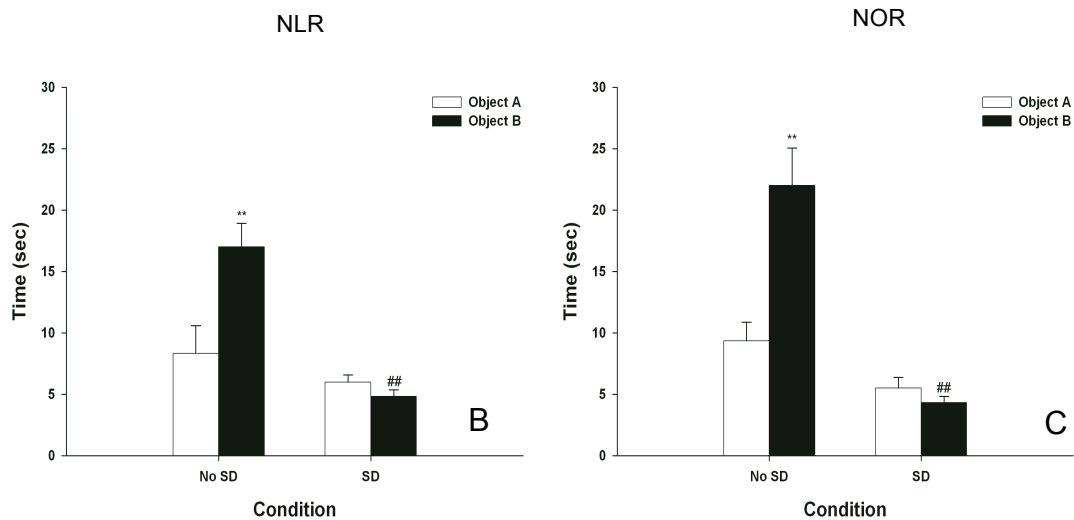


Fig. 30. Efecto de la privación de sueño sobre el reconocimiento de objeto en *O. degus* añosas. B) Tiempo de exploración (segundos) del Objeto A y del Objeto B por los grupos No SD y SD durante el ensayo de reconocimiento de lugar (NLR) (n = 14); ** p < 0.01, respecto al Objeto A; # p < 0.05, respecto al grupo No SD. C) Tiempo de exploración (segundos) del Objeto A y del Objeto B por los grupos No SD y SD durante el ensayo de reconocimiento de objeto (NOR) (n = 14); ** p < 0.01, respecto al Objeto A; # p < 0.05, respecto al grupo No SD.

2. Efecto de la edad y la privación de sueño en la memoria y el aprendizaje del *O. degus*

2.1. Efecto sumatorio de la edad y la privación de sueño medido con el paradigma de Radial Arm Maze

Para comprobar el efecto de la edad y la privación de sueño conjuntamente, se realizó un ANOVA de dos factores (Edad x Condición) sobre la media de la latencia. El análisis mostró un efecto significativo de la Edad [$F(1,22) = 10.150$; $p < 0.01$] y de la Condición [$F(1,22) = 75.875$; $p < 0.01$]. La privación de sueño aumentó la latencia de entrada en el primer brazo del laberinto en los animales jóvenes. Resultados similares se hallaron en el experimento con *O. degus* viejas. Sin embargo, no se halló efecto de la interacción entre factores (Fig. 31A). El análisis del tiempo total mostró que la privación de sueño aumentaba de forma similar el tiempo para completar el

ejercicio, tanto en animales jóvenes como en animales viejos. El análisis mostró un efecto significativo de la Condición [$F(1,22) = 58.666$; $p < 0.01$]. No se halló efecto de la Edad ni de la interacción (Fig. 31B).

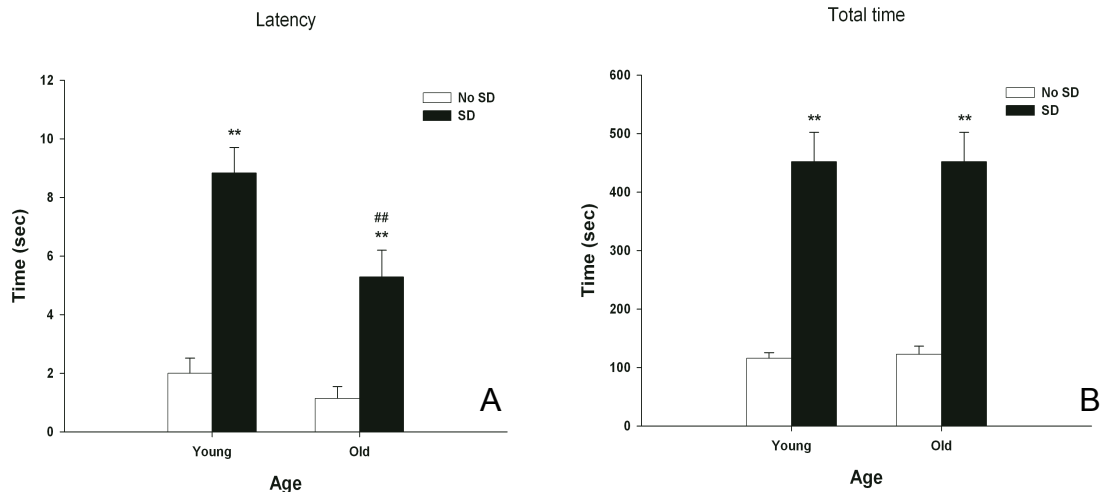


Fig. 31. Efecto de la edad y la privación de sueño sobre la latencia y el tiempo total en el RAM. A) Latencia de entrada en el primer brazo (segundos), y B) Tiempo total de duración del test (segundos) en los grupos de *O. degus* jóvenes y viejas ($n = 30$). ** $p < 0.01$, significativo respecto al grupo No SD; # $p < 0.05$, respecto del grupo de *O. degus* jóvenes.

El análisis de los errores de memoria de referencia y los errores de memoria de trabajo, siguió el mismo proceso. El ANOVA mostró un efecto significativo de la Condición [$F(1,22) = 55.796$; $p < 0.01$], no hallándose efecto de la interacción ni la Edad. Como se observa en la figura, la condición SD muestra unos errores significativamente más elevados que la condición de sueño normal ($p < 0.01$) (Fig. 31C). El análisis de los errores de memoria de trabajo halló un efecto de la Edad [$F(1,22) = 18.041$; $p < 0.01$] y la Condición [$F(1,22) = 78.087$; $p < 0.01$]. Sin embargo, en este caso sí se encontró un efecto en la interacción [$F(1,22) = 7.741$; $p < 0.05$]. El test Tukey posterior especificó que aparte del incremento significativo de los errores bajo la condición de SD ($p < 0.01$), el grupo de las *O. degus* viejas cometió más errores, en comparación con las *O. degus* jóvenes en la misma condición de SD (Fig. 31D).

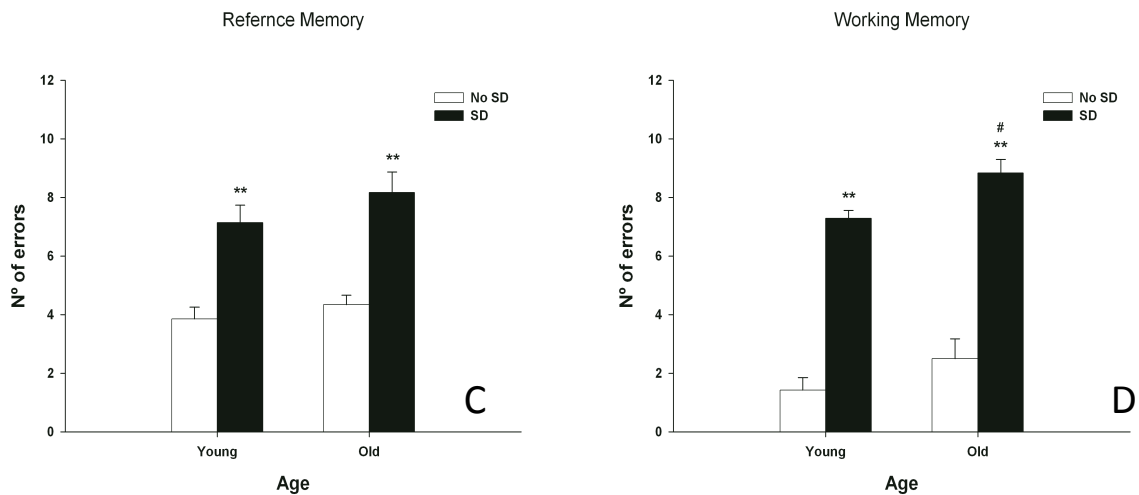


Fig. 31. Efecto de la edad y la privación de sueño sobre los errores de memoria en el RAM. C) Número de errores de memoria de referencia, y D) número de errores de memoria de trabajo durante el test en los grupos de *O. degus* jóvenes y viejas (n = 30). ** p < 0.01, significativo respecto al grupo No SD; # p < 0.05, respecto del grupo de *O. degus* jóvenes.

2.2. Efecto sumatorio de la edad y la privación de sueño medido con el paradigma de Barnes Maze

Para valorar los efectos sumatorios de la edad y la privación de sueño, se sometió a los animales viejos y con privación de sueño al laberinto de Barnes. El análisis mostró un efecto significativo de la Condición [$F(1,22) = 37.019$; $p < 0.01$]. Sin embargo, no se halló efecto de la interacción ni de la Edad (Fig. 32A). El análisis del tiempo total se analizó también con un ANOVA de dos factores (Edad x Condición). El mismo procedimiento se utilizó para analizar el tiempo total empleado por los animales para completar el ensayo. De nuevo, la privación de sueño causó un incremento significativo en el tiempo total del ensayo ($p < 0.01$), aunque el análisis no reveló ningún efecto significativo de la edad ni la interacción entre ambos factores (Fig. 32B).

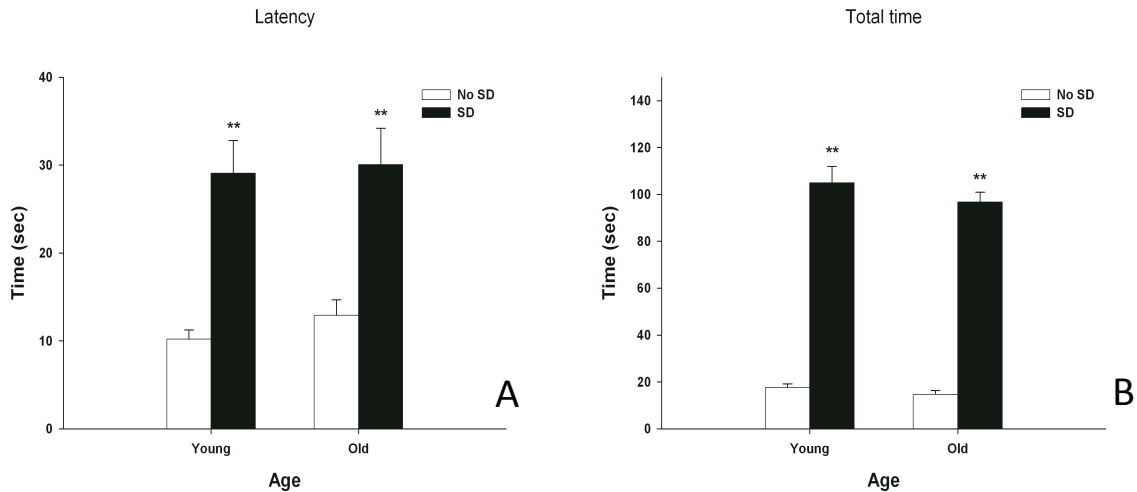


Fig. 32. Efecto de la edad y la privación de sueño sobre la latencia y el tiempo total en el BM. A) Latencia de entrada en el agujero de escape (media en segundos de los cuatro ensayos), y B) Tiempo total de duración (media en segundos de los cuatro ensayos) durante la sesión de test (n = 30) en los grupos de *O. degus* jóvenes y viejas. * p < 0.05; ** p < 0.01, respecto al grupo No SD.

Al analizar los errores de referencia y de memoria de trabajo en función de la edad y la privación de sueño, se halló un incremento significativo causados por la Edad [$F(1,22) = 17.154$; $p < 0.01$] y la Condición [$F(1,22) = 35.903$; $p < 0.01$]. Aunque no se encontró efecto de interacción, la prueba post hoc de Tukey reveló que las *O. degus* viejas cometieron más errores bajo la condición de SD, en comparación con las jóvenes en la misma condición ($p < 0.01$) (Fig. 32C). Respecto a los errores de memoria de trabajo, el análisis posterior no mostró esta diferencia (Fig. 32D).

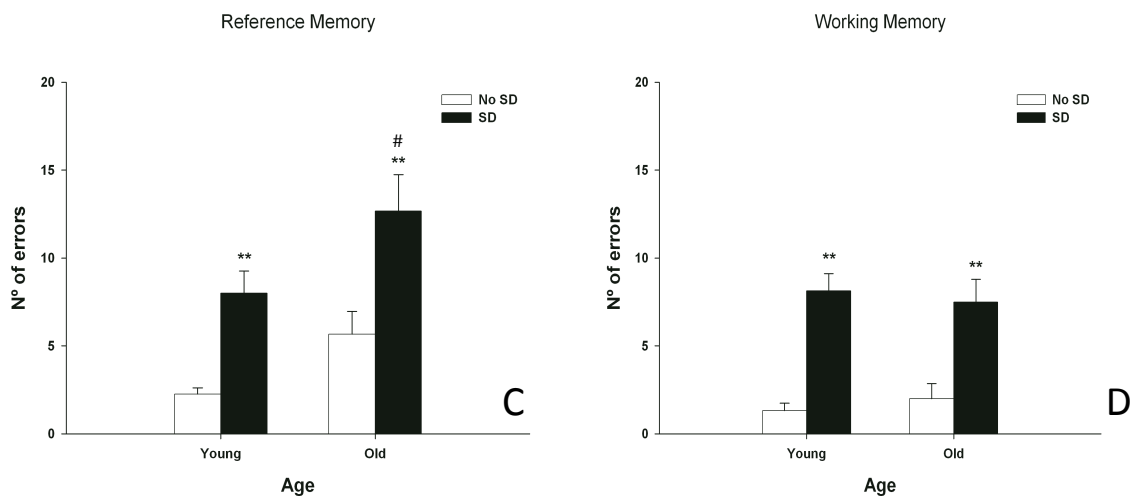


Fig. 32. Efecto de la edad y la privación de sueño sobre los errores de memoria en el BM. C) Número de errores de referencia (media de los cuatro ensayos), y D) Número de errores de memoria de trabajo (media de los cuatro ensayos) durante la sesión de test (n = 30) en los grupos de *O. degus* jóvenes y viejas. ** p < 0.01, significativo respecto al grupo No SD; # p < 0.05, respecto del grupo de *O. degus* jóvenes

2.3. Efecto sumatorio de la edad y la privación de sueño medido con el paradigma de Novel Object Recognition

El tratamiento de los resultados obtenidos mediante el paradigma de NOR se hizo mediante un ANOVA de tres factores (Edad x Condición x Objeto) sobre los ensayos de Familiarización, NLR y NOR. El análisis mostró un efecto significativo de la Edad [$F(1,48) = 8.012$; $p < 0.01$], la Condición [$F(1,48) = 20.721$; $p < 0.01$] y el Objeto [$F(1,48) = 10.205$; $p < 0.01$]. También se encontró un efecto de la interacción entre los factores Condición y Objeto [$F(1,48) = 11.812$; $p < 0.01$]. La prueba de Tukey reveló que en el ensayo de Familiarización no existían diferencias entre los grupos en el tiempo de exploración de los objetos (Fig. 33A).

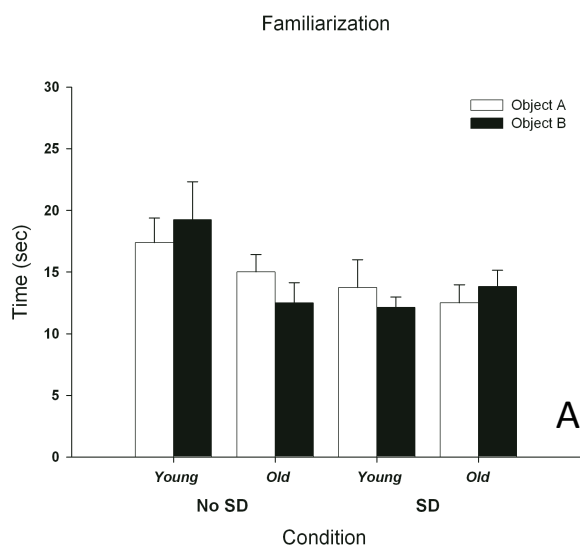


Fig. 33. Efecto de edad y la privación de sueño sobre el reconocimiento de objeto en *O. degus* añosas. A) Tiempo de exploración (segundos) del Objeto A y del Objeto B por los grupos No SD y SD en los grupos de *O. degus* jóvenes y viejas durante el ensayo de familiarización ($n = 30$).

La prueba realizada sobre el NLR reveló que existían diferencias significativas. Un análisis más exhaustivo permitió determinar que estas diferencias se encontraban en el tiempo de exploración del Objeto 2 en la Condición de No SD, tanto por parte de las *O. degus* jóvenes como viejas ($p < 0.01$). Asimismo, se halló una reducción significativa del tiempo de exploración del Objeto 2 bajo condiciones de SD, tanto para los animales jóvenes como para los viejos ($p < 0.01$),

siendo esta reducción más significativa incluso en el grupo de las *O. degus* viejas, en comparación con los jóvenes bajo las mismas condiciones de SD ($p < 0.01$) (Fig. 33B). El análisis de NOR arrojó similares resultados. Se mostró un aumento significativo del tiempo de exploración del Objeto 2 en la condición de No SD ($p < 0.01$). En condiciones de SD, en cambio, no había diferencias en el tiempo de exploración de los objetos, aunque sí entre los grupos de edad, siendo significativamente menor el tiempo de exploración en las *O. degus* viejas respecto a los jóvenes en la misma condición ($p < 0.01$) (Fig. 33C).

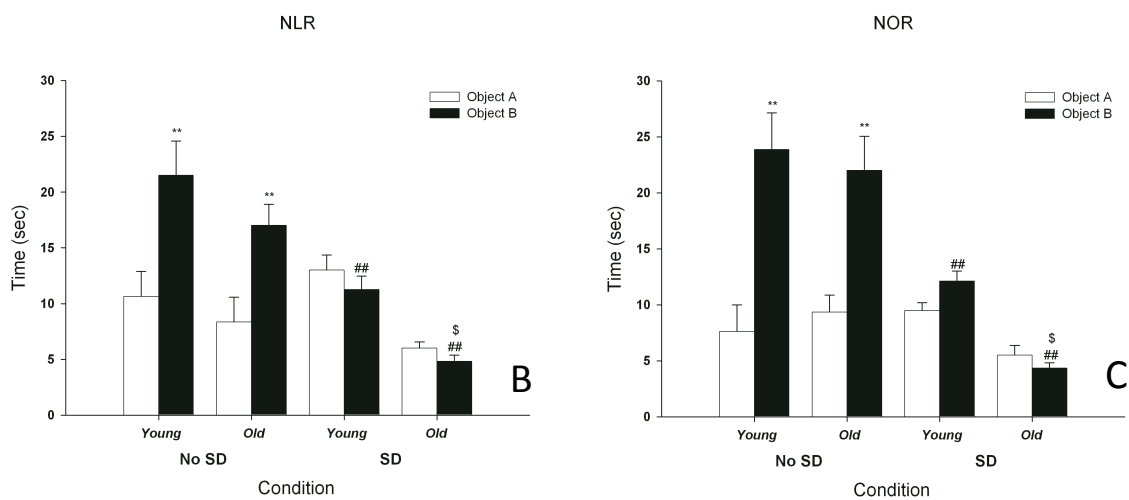


Fig. 33. Efecto de edad y la privación de sueño sobre el reconocimiento de objeto en *O. degus* añosas. B) Tiempo de exploración (segundos) del Objeto A y del Objeto B por los grupos No SD y SD en los grupos de *O. degus* jóvenes y viejas durante el ensayo de reconocimiento de lugar (NLR) ($n = 30$); ** $p < 0.01$, respecto al Objeto A; ## $p < 0.05$, respecto al grupo No SD. C) Tiempo de exploración (segundos) del Objeto A y del Objeto B por los grupos No SD y SD en los grupos de *O. degus* jóvenes y viejas durante el ensayo de reconocimiento de objeto (NOR) ($n = 30$); ** $p < 0.01$, respecto al Objeto A; ## $p < 0.01$, respecto al grupo No SD; \$ $p < 0.01$, respecto del grupo de *O. degus* jóvenes.

A tenor de estos resultados parece evidente que la privación de sueño, aplicada en estas condiciones particulares, es capaz de provocar un deterioro cognitivo tanto en animales jóvenes como viejos. No obstante, aunque parece que para estos animales la diferencia de edad no es un factor importante en la ejecución de los tests bajo condiciones de sueño normal, los resultados muestran, sin embargo, que sí resulta significativa bajo condiciones privación de sueño.

3. Efecto de memantina sobre la edad y el deterioro de memoria inducido por privación de sueño

3.1. Efecto de memantina sobre la edad y el deterioro de memoria inducido por privación de sueño evaluado mediante Radial Arm Maze

Para comprobar el efecto de la memantina, antagonista de los receptores NMDA de Glut, sobre la privación de sueño y la edad se realizó un ANOVA de tres factores (Dosis x Edad x Condición) sobre la latencia, el tiempo total del ensayo y los errores de memoria, tanto de referencia como de trabajo, cometidos el día del test. El análisis mostró un efecto significativo de la Dosis [$F(1,43) = 26.043$; $p < 0.01$] y de la Condición [$F(1,43) = 57.272$; $p < 0.01$]. Se halló un efecto en la interacción entre la Dosis y la Edad [$F(1,43) = 10.359$; $p < 0.01$] y la Dosis y la Condición [$F(1,43) = 37.786$; $p < 0.01$]. Un análisis post hoc de Tukey reveló diferencias significativas en los grupos de edad sin tratamiento y con privación de sueño normal ($p < 0.01$). No se encontraron diferencias entre los grupos de diferente edad en la condición de sueño normal ni en el grupo tratado con memantina. Se hallaron diferencias significativas en los grupos tratados con memantina y privados de sueño, en comparación con los grupos similares sin tratamiento ($p < 0.05$, $p < 0.01$) (Fig. 34A).

El mismo análisis sobre el tiempo total de duración del ensayo mostró un resultado similar. El ANOVA mostró un efecto significativo de la Dosis [$F(1,44) = 46.119$; $p < 0.01$] y de la Condición [$F(1,44) = 34.664$; $p < 0.01$]. Se halló un efecto en la interacción entre la Dosis y la Edad [$F(1,44) = 10.734$; $p < 0.01$] y la Dosis y la Condición [$F(1,44) = 53.550$; $p < 0.01$]. Mediante el análisis post hoc de Tukey se hallaron diferencias significativas en los grupos de *O. degus* jóvenes y viejas con privación de sueño y sin tratamiento, en comparación con los grupos de la misma edad en condiciones de sueño normal ($p < 0.01$). No se hallaron diferencias en el tiempo entre los grupos con tratamiento, pero sí en la condición de privación de sueño respecto a los grupos no tratados ($p < 0.01$) (Fig. 34B).

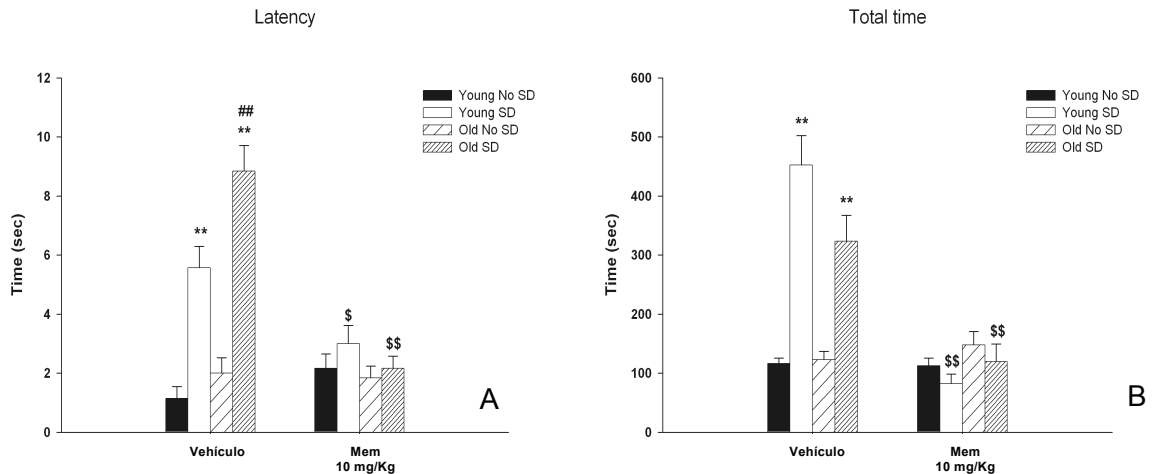


Fig. 34. Efecto de la memantina sobre la edad y la privación de sueño en la latencia y el tiempo total en el RAM. A) Latencia de entrada en el primer brazo (segundos) y B) Tiempo total de duración del test (segundos) en los grupos de *O. degus* jóvenes y viejas con tratamiento (Memantina 10 mg/Kg i.p.) y sin tratamiento (n = 30). ** p < 0.01, respecto al grupo No SD; ## p < 0.01, respecto al grupo de *O. degus* jóvenes; \$ p < 0.05, \$\$ p < 0.01, respecto a los grupos tratados con vehículo.

Respecto a los errores de memoria, el ANOVA mostró un efecto significativo de la Dosis [F(1,44) = 63.779; p < 0.01], de la Edad [F(1,44) = 20.006; p < 0.01] y de la Condición [F(1,44) = 20.806; p < 0.01]. También se halló un efecto en la interacción entre la Edad y la Condición [F(1,44) = 5.101; p < 0.05] y la Dosis y la Condición [F(1,44) = 42.765; p < 0.01]. El análisis de Tukey mostró un número de errores significativamente mayor en los grupos de ambas edades con privación de sueño (p < 0.01). También se halló una diferencia significativa entre las *O. degus* jóvenes y viejas bajo la condición de privación de sueño (p < 0.05). No se halló diferencias entre los distintos grupos con tratamiento. Sí se hallaron diferencias en los grupos de *O. degus* jóvenes y viejas con privación de sueño y tratamiento, en comparación con los grupos de condición similar pero sin tratamiento (p < 0.05, p < 0.01) (Fig. 34C). Acerca de los errores en la memoria de trabajo, el análisis de varianza mostró un efecto significativo de la Dosis [F(1,44) = 15.172; p < 0.01], de la Edad [F(1,44) = 12.304; p < 0.01] y de la Condición [F(1,44) = 30.770; p < 0.01]. Se halló un efecto en la interacción entre la Dosis y la Condición [F(1,44) = 30.544; p < 0.01] y entre los tres factores: Dosis, Edad y Condición [F(1,44) = 6.089; p < 0.05]. El análisis de Tukey las

diferencias se hallaron entre los grupos con privación de sueño y sueño normal sin tratamiento ($p < 0.01$) y en el grupo de *O. degus* viejas con privación de sueño sin tratamiento, en comparación con el grupo similar con tratamiento ($p < 0.01$) (Fig. 34D).

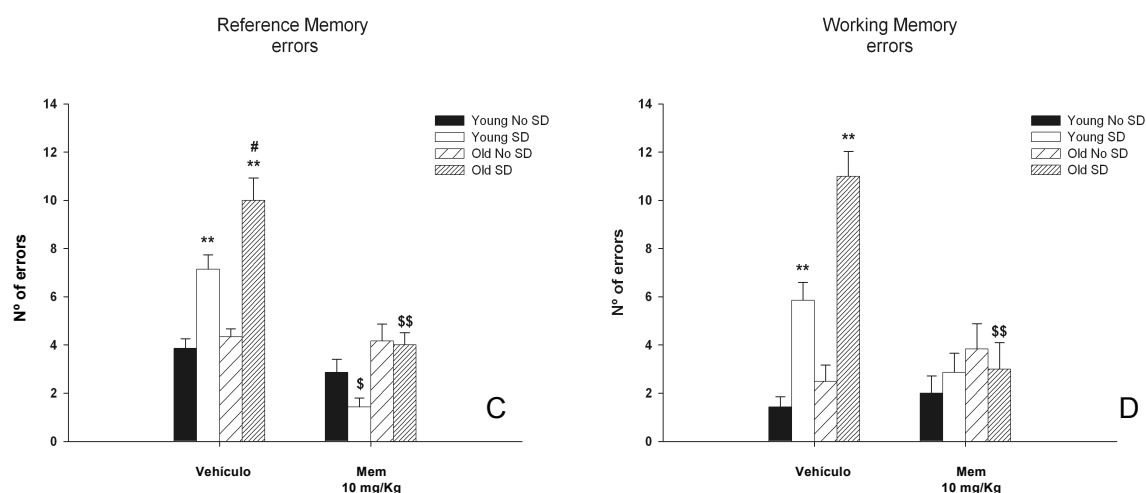


Fig. 34. Efecto de la memantina sobre la edad y la privación de sueño en los errores de memoria en el RAM. **C)** Número de errores de referencia y **D)** Número de errores de memoria de trabajo en la sesión de test. ** $p < 0.01$, respecto al grupo No SD ($n = 30$); # $p < 0.05$, respecto al grupo de *O. degus* jóvenes; \$ $p < 0.05$, \$\$ $p < 0.01$, respecto a los grupos tratados con vehículo.

3.2. Efecto de memantina sobre la edad y el deterioro de memoria inducido por privación de sueño evaluado mediante Barnes Maze

El efecto de la memantina sobre las variables registradas en la Barnes Maze se analizó mediante un ANOVA de tres factores (Dosis x Edad x Condición), similar al de la Radial Arm Maze. El análisis de la latencia mostró un efecto significativo de la Dosis [$F(1,48) = 28.145$; $p < 0.01$], de la Edad [$F(1,48) = 4.964$; $p < 0.05$] y de la Condición [$F(1,48) = 22.623$; $p < 0.01$]. También se halló un efecto en la interacción entre la Dosis y la Condición [$F(1,48) = 21.978$; $p < 0.01$]. Un análisis post hoc de Tukey mostró diferencias significativas en los grupos de edad sin tratamiento y con privación de sueño normal ($p < 0.05$, $p < 0.01$). Se hallaron diferencias significativas en los grupos tratados con memantina y privados de sueño, en comparación con los

grupos similares sin tratamiento ($p < 0.05$) (Fig. 35A). No se hallaron diferencias entre las *O. degus* jóvenes y viejas en la condición de privación de sueño.

El tiempo total se analizó igualmente con un ANOVA similar. El análisis mostró un efecto significativo de la Dosis [$F(1,48) = 379.322$; $p < 0.01$], de la Edad [$F(1,48) = 9.927$; $p < 0.01$] y de la Condición [$F(1,48) = 399.180$; $p < 0.01$]. Se halló un efecto en la interacción entre la Dosis y la Condición [$F(1,48) = 323.623$; $p < 0.01$]. El análisis pos hoc de Tukey reveló diferencias significativas en los grupos de *O. degus* jóvenes y viejas con privación de sueño y sin tratamiento, en comparación con los grupos de la misma edad en condiciones de sueño normal ($p < 0.01$). No se hallaron diferencias en el tiempo entre los grupos con tratamiento, pero sí en la condición de privación de sueño respecto a los grupos no tratados ($p < 0.01$) (Fig. 35B).

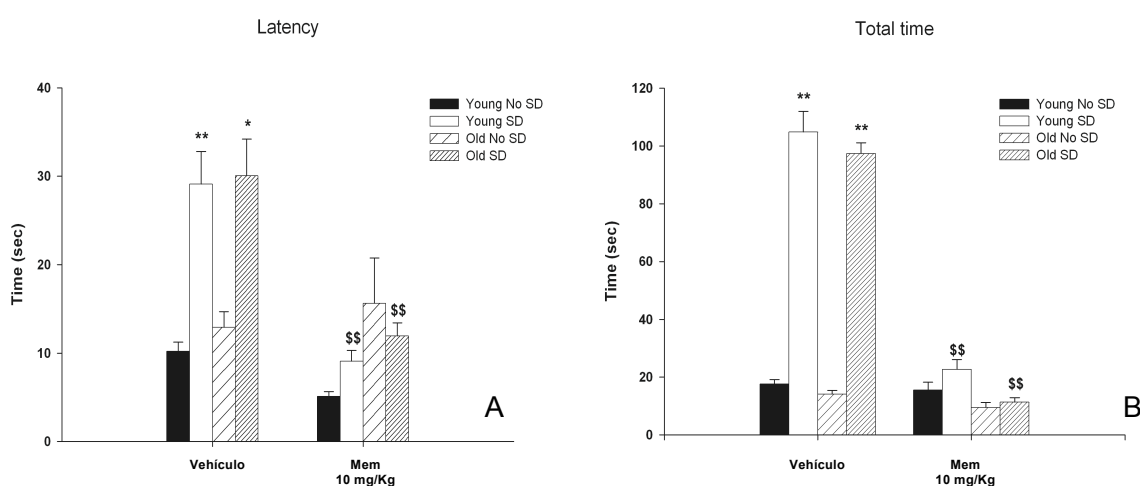


Fig. 35. Efecto de la memantina sobre la edad y la privación de sueño en la latencia y el tiempo total en el BM. A) Latencia de entrada en el agujero de escape (media en segundos de los cuatro ensayos) y B) Tiempo total de duración del test (media en segundos de los cuatro ensayos) en los grupos de *O. degus* jóvenes y viejas con tratamiento (Memantina 10 mg/Kg IP) y sin tratamiento ($n = 30$). ** $p < 0.01$, respecto al grupo No SD; \$\$ $p < 0.01$, respecto a los grupos tratados con vehículo.

Se analizó mediante un ANOVA de tres factores (Dosis x Edad x Condición) los errores de memoria de referencia y los errores de memoria de trabajo. El análisis mostró un efecto significativo de la Dosis [$F(2,47) = 20.999$; $p < 0.01$], de la Edad [$F(2,47) = 28.808$; $p < 0.01$] y de la Condición [$F(2,47) = 32.915$; $p < 0.01$]. Se halló un efecto en la interacción entre la Dosis y la Condición [$F(2,47) = 30.649$; $p < 0.01$]. Un análisis post hoc de Tukey reveló que un número de

errores significativamente mayor bajo la condición de privación de sueño en los grupos de *O. degus* jóvenes y viejas, tanto en errores de memoria de referencia (Fig. 35C) como de memoria de trabajo (Fig. 35D).

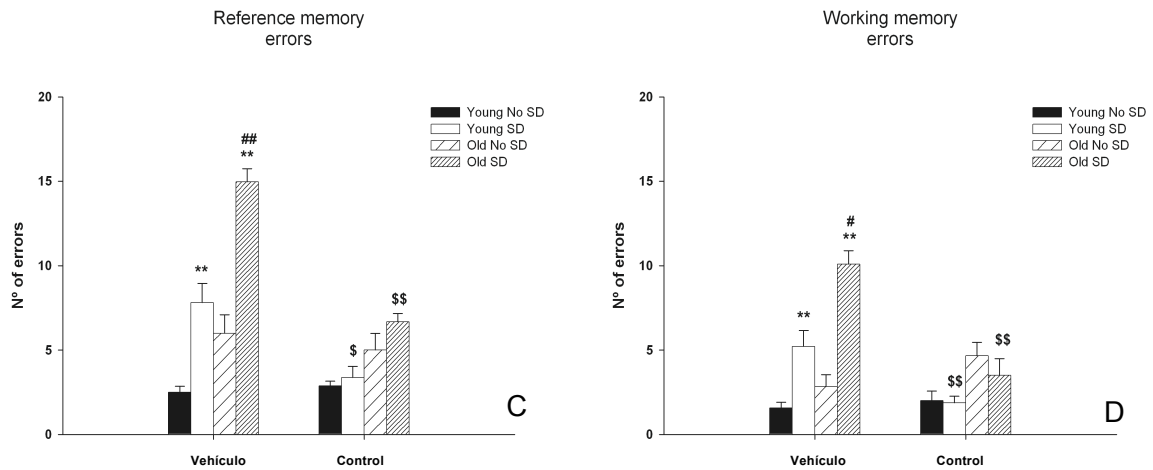


Fig. 35. Efecto de la memantina sobre la edad y la privación de sueño en los errores de memoria en el BM. C) Número de errores de referencia y D) Número de errores de memoria de trabajo en la sesión de test. ** $p < 0.01$, respecto al grupo No SD ($n=30$); # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, respecto al grupo de *O. degus* jóvenes; \$ $p < 0.05$, \$\$ $p < 0.01$, respecto a los grupos tratados con vehículo.

3.3. Efecto de memantina sobre la edad y el deterioro de memoria inducido por privación de sueño evaluado mediante Novel Object Recognition

El análisis de los resultados del test de NOR se llevó a cabo mediante una ANOVA. El análisis del ensayo de familiarización no reveló efectos significativos por parte de ninguno de los tres factores (Dosis, Edad, o Condición) (Fig. 36A).

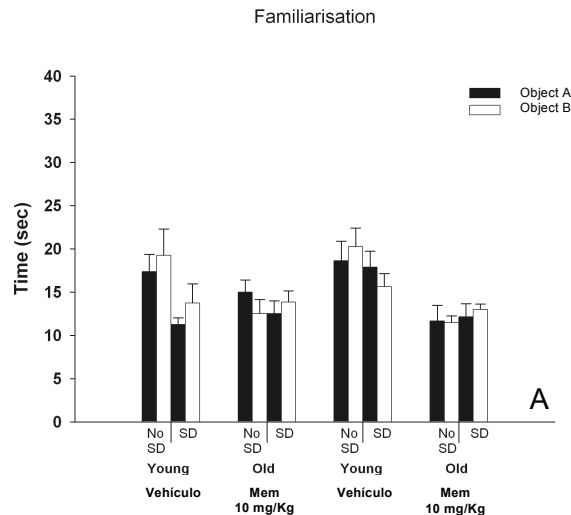


Fig. 36. Efecto de la memantina sobre la edad y la privación de sueño en la latencia y el tiempo total en el reconocimiento de objeto. A) Tiempo de exploración (segundos) del Objeto A y del Objeto B por los grupos de *O. degus* jóvenes y viejas, con y sin tratamiento bajo sueño normal y privación de sueño durante el ensayo de familiarización (n = 30).

El análisis del ensayo de NLR reveló un efecto significativo de la Dosis [$F(2,47) = 10.755$; $p < 0.01$], de la Edad [$F(2,47) = 9.476$; $p < 0.01$] y de la Condición [$F(2,47) = 23.711$; $p < 0.01$]. También se halló un efecto de la interacción entre la Dosis y la Condición [$F(2,47) = 14.902$; $p < 0.01$]. La prueba post hoc de Tukey reveló diferencias significativas en el tiempo de exploración del objeto situado en el lugar nuevo en la condición de sueño normal sin tratamiento, tanto para el grupo de *O. degus* jóvenes ($p < 0.05$) como viejas ($p < 0.05$). También fue significativamente mayor el tiempo explorando este objeto en las condiciones tanto de sueño normal como de privación de sueño en los dos grupos de edad con tratamiento ($p < 0.05$, $p < 0.01$). No se encontraron diferencias en el tiempo de exploración de los objetos en los grupos con privación de sueño sin tratamiento (Fig. 36B).

El análisis de NOR arrojó similares resultados. El ANOVA mostró un efecto significativo de la Dosis [$F(2,47) = 4.129$; $p < 0.05$] y la Condición [$F(2,47) = 22.852$; $p < 0.01$]. También se encontró un efecto de la interacción de la Dosis y la Condición [$F(2,47) = 5.443$; $p < 0.01$], así como de la interacción entre la Dosis, la Edad y la Condición [$F(2,47) = 5.479$; $p < 0.01$]. Un análisis post hoc de Tukey reveló diferencias significativas en el tiempo de exploración del objeto nuevo por parte de los animales jóvenes y viejos en condición de sueño normal, con y sin

tratamiento ($p < 0.05$, $p < 0.01$). No se encontraron diferencias en el tiempo de exploración de los objetos en la condición de privación de sueño sin tratamiento (Fig. 36C).

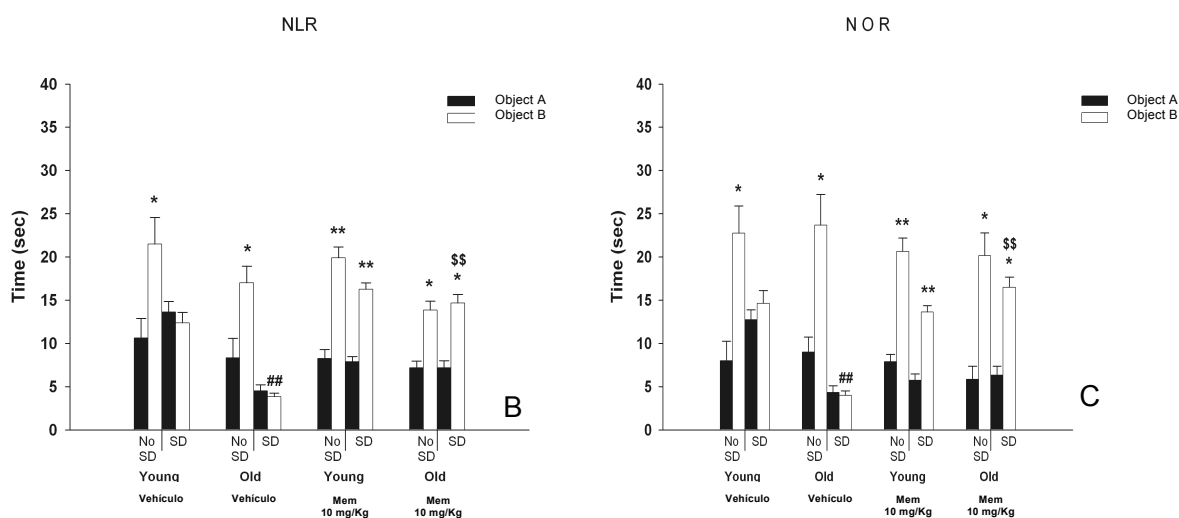


Fig. 36. Efecto de la memantina sobre la edad y la privación de sueño en la latencia y el tiempo total en el reconocimiento de objeto. B) Tiempo de exploración (segundos) del Objeto A y del Objeto B por los grupos No SD y SD en los grupos de *O. degus* jóvenes y viejas durante el ensayo de reconocimiento de lugar (NLR) ($n = 30$); ** $p < 0.01$, respecto al Objeto A; # $p < 0.05$, respecto al grupo No SD. C) Tiempo de exploración (segundos) del Objeto A y del Objeto B por los grupos No SD y SD en los grupos de *O. degus* jóvenes y viejas durante el ensayo de reconocimiento de objeto (NOR) ($n = 30$); ** $p < 0.01$, respecto al Objeto A; ## $p < 0.01$, respecto al grupo No SD; \$ $p < 0.01$, respecto del grupo de *O. degus* jóvenes.

4. Medición de los niveles de corticosterona en *O. degus* de distintas edades bajo condiciones de sueño normal y privación de sueño

Para valorar la influencia del estrés en los resultados experimentales hallados en los animales, se analizaron los niveles de corticosterona en plasma de las *O. degus* de distintas edades (jóvenes vs. Viejas) y condiciones de sueño (SD vs. No SD). El análisis mostró un efecto de la Condición [$F(1,25) = 24.782$; $p < 0.01$]. También se halló un efecto de la interacción [$F(3,25) = 4.203$; $p < 0.05$].

Una prueba posterior más exhaustiva determinó diferencias significativas en el nivel de corticosterona en los grupos de 12 ($p < 0.05$) y 48 ($p < 0.01$) meses de edad bajo condiciones de SD. También se encontró que el nivel de cortisol en este mismo grupo, era significativamente más

elevado en las *O. degus* de 48 meses ($p < 0.01$). No se hallaron diferencias significativas en el nivel de cortisol de las *O. degus* de distintas edades bajo condiciones de sueño normal (Fig. 37).

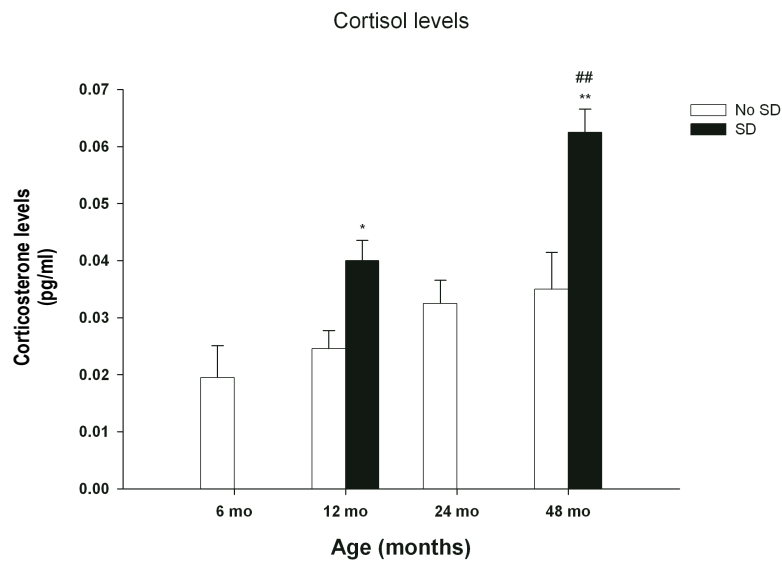


Fig. 37. Niveles de corticosterona. Niveles de corticosterona (pg/ml) hallados en condiciones No SD y SD en los diferentes grupos de edad de las *O. degus*, ($n = 20$). * $p < 0.05$ significativo respecto del grupo No SD; ## $p < 0.01$, respecto del grupo de *O. degus* de 12 meses.

5. Efecto de la edad sobre los niveles de neurotransmisores implicados en procesos de aprendizaje y memoria en el *O. degus*

5.1. Niveles de glutamato, acetilcolina, dopamina, serotonina y melatonina en la corteza frontal de *O. degus* de diferentes edades (6, 12 y 36 meses)

El resultado del análisis por HPLC sobre la corteza frontal de las *O. degus* de 6, 12 y 36 meses para los diferentes compuestos mostró algunas diferencias en los niveles de Glut y ACh (Fig. 38).

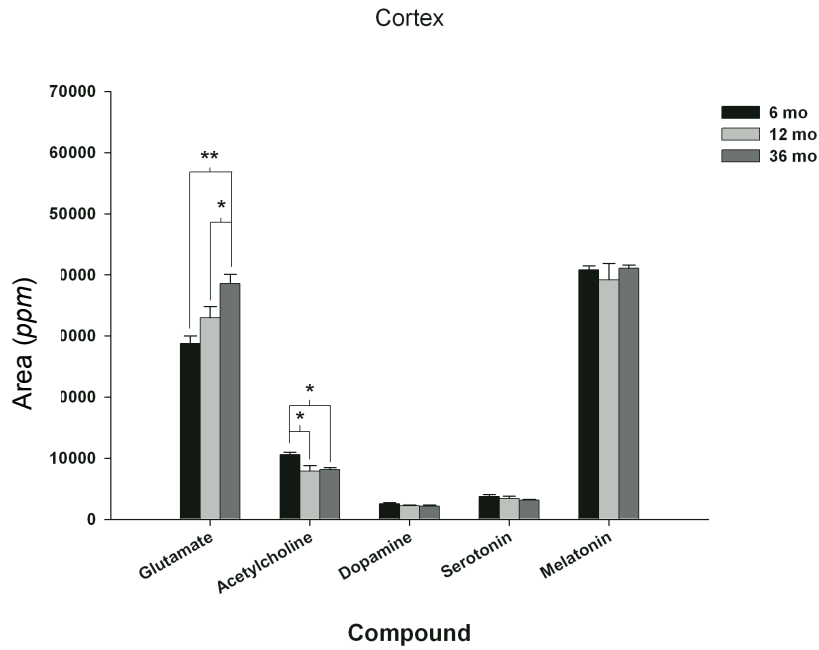


Fig. 38. Niveles de neurotransmisores en la corteza frontal. Niveles de Glut, ACh, DA, 5HT y melatonina (partes por millón) en la corteza frontal de las *O. degus* de diferentes edades (n = 15). * p < 0.05, ** p < 0.01, respecto de los diferentes grupos de edad.

Un ANOVA de dos factores (Edad x Compuesto) con medidas repetidas mostró un efecto significativo de la Edad [$F(2,51) = 4.206$; $p < 0.05$] y del Compuesto [$F(4,51) = 794.885$; $p < 0.01$]. También se halló un efecto de la interacción [$F(8,51) = 7.883$; $p < 0.01$]. La prueba Tukey posterior detalló que las diferencias en la corteza frontal se encontraban en los niveles de Glut entre las *O. degus* de 6 y 36 meses ($p < 0.01$) y las *O. degus* de 12 y 36 meses ($p < 0.05$) (Fig. 39A). También se hallaron diferencias significativas en los niveles de Ach entre las *O. degus* de 6 y 12 meses ($p < 0.05$) y 6 y 36 meses ($p < 0.05$) (Fig. 39B).

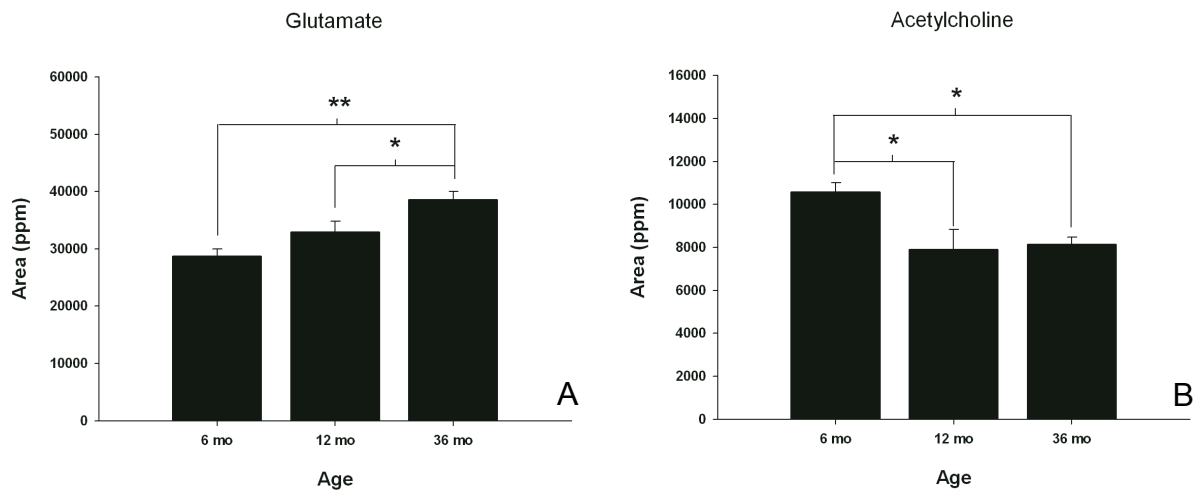


Fig. 39. Niveles de neurotransmisores en la corteza frontal de *O. degus* de diferentes edades. A) Niveles de Glut (partes por millón) en la corteza frontal de *O. degus* de 6, 12 y 36 meses de edad (n =15). * p < 0.05, entre los grupos de 12 y 36 meses; ** p < 0.01, entre los grupos de 6 y 36 meses. B) Niveles de ACh (partes por millón) en la corteza frontal de *O. degus* de 6, 12 y 36 meses de edad (n =15). * p < 0.05, respecto al grupo de 6 meses de edad.

Se halló una tendencia decreciente en los niveles de 5-HT (Fig. 39D), pero no lo suficientemente significativa. Como tampoco lo fueron los niveles de DA (Fig. 39C).

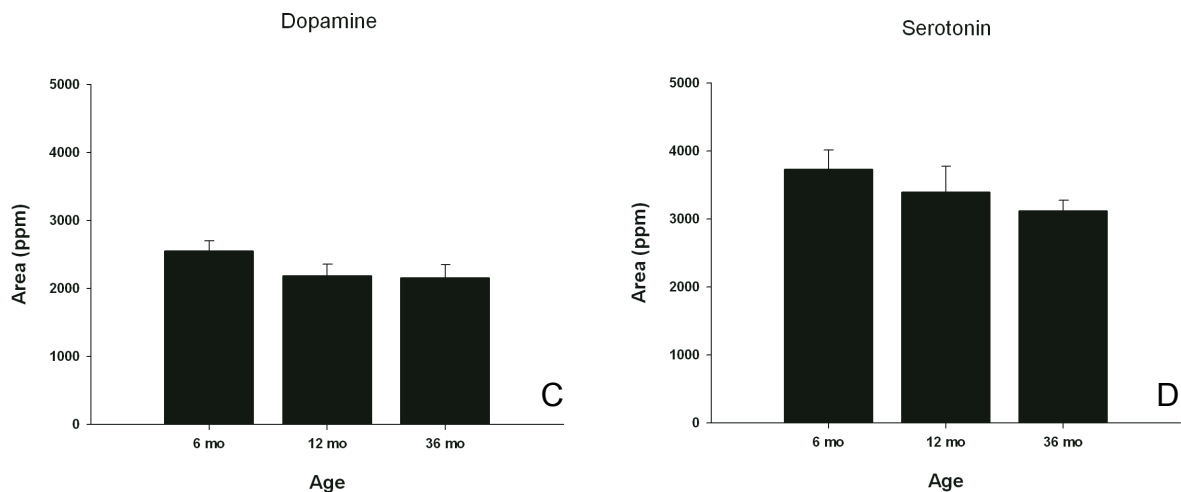


Fig. 39. Niveles de neurotransmisores en la corteza frontal de *O. degus* de diferentes edades. C) Niveles de DA (partes por millón) en la corteza frontal de *O. degus* de 6, 12 y 36 meses de edad (n =15). D) Niveles de 5HT (partes por millón) en la corteza frontal de *O. degus* de 6, 12 y 36 meses de edad (n =15).

Tampoco se hallaron diferencias en los niveles ni melatonina entre los diferentes grupos (Fig. 39E).

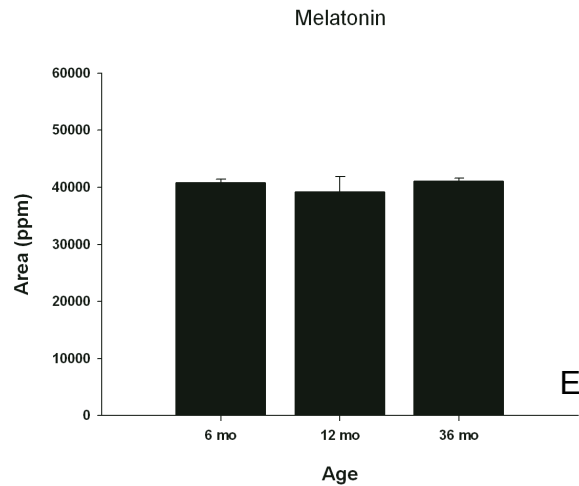


Fig. 39. Niveles de neurotransmisores en la corteza frontal de *O. degus* de diferentes edades. E) Niveles de melatonina (partes por millón) en la corteza frontal de *O. degus* de 6, 12 y 36 meses de edad (n =15).

5.2. Niveles de glutamato, acetilcolina, dopamina, serotonina y melatonina en el hipocampo de *O. degus* de diferentes edades (6, 12 y 36 meses)

El análisis por HPLC de los distintos compuestos en el hipocampo de los distintos grupos de *O. degus* mostró algunas diferencias en los niveles de los elementos tenidos en cuenta (Fig. 40).

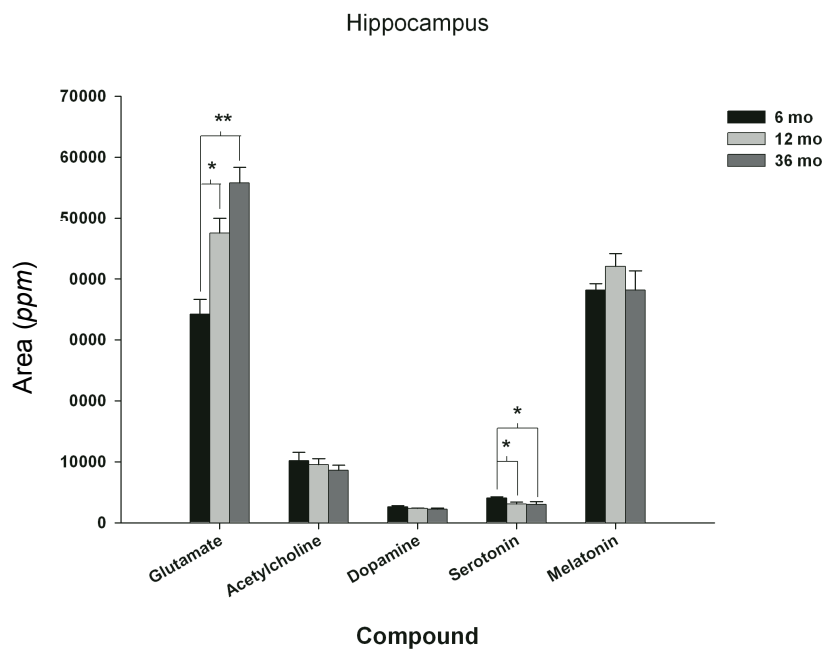


Fig. 40. Niveles de neurotransmisores en el hipocampo. Niveles de Glut, ACh, DA, 5HT y melatonina (partes por millón) en el hipocampo de las *O. degus* de diferentes edades (n = 15). * p < 0.05, ** p < 0.01, respecto de los diferentes grupos de edad.

El ANOVA de dos factores con medidas repetidas (Edad x Compuesto) ya había mostrado un efecto tanto de la edad [$F(2,51) = 4.206$; $p < 0.05$] como del Compuesto [$F(4,51) = 794.885$; $p < 0.01$]. Además de un efecto de la interacción [$F(8,51) = 7.883$; $p < 0.01$]. El post hoc de Tukey mostró diferencias significativas en los niveles de Glut entre los grupos de *O. degus* de 6 y 36 meses ($p < 0.01$) y entre los grupos de 6 y 12 meses ($p < 0.05$) (Fig. 41A). No se hallaron diferencias significativas en los niveles de ACh (Fig. 41B).

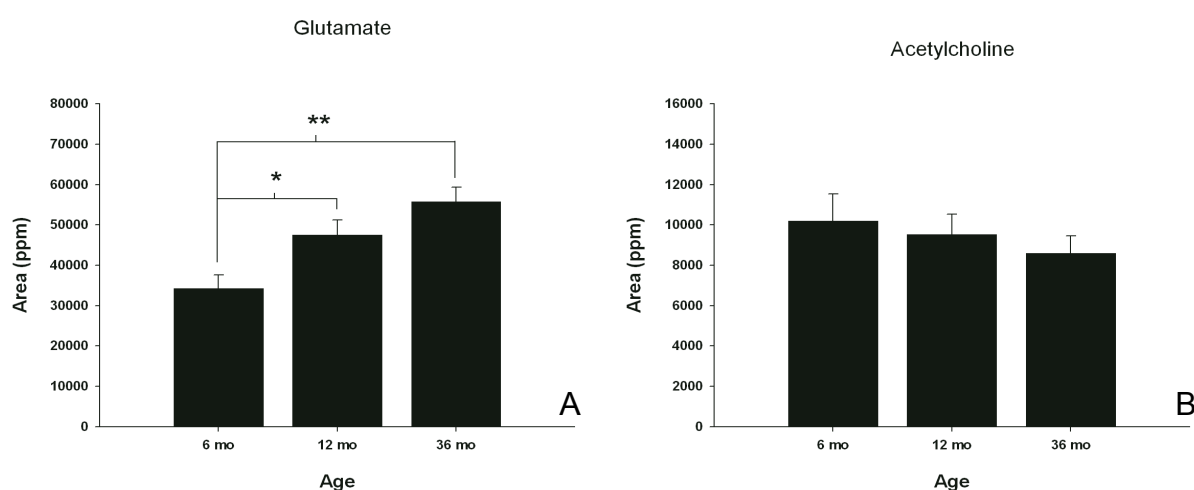


Fig. 41. Niveles de neurotransmisores en el hipocampo de *O. degus* de diferentes edades. A) Niveles de Glut (partes por millón) en el hipocampo de *O. degus* de 6, 12 y 36 meses de edad ($n = 15$). * $p < 0.05$, entre los grupos de 6 y 12; ** $p < 0.01$, entre los grupos de 6 y 36 meses. B) Niveles de ACh (partes por millón) en el hipocampo de *O. degus* de 6, 12 y 36 meses de edad ($n = 15$).

Aunque el análisis no mostró diferencias en los niveles de DA (Fig. 41C), sí se hallaron en los niveles de 5HT entre los grupos de 6 y 12 meses ($p < 0.05$) y 6 y 36 meses ($p < 0.05$) (Fig. 41D).

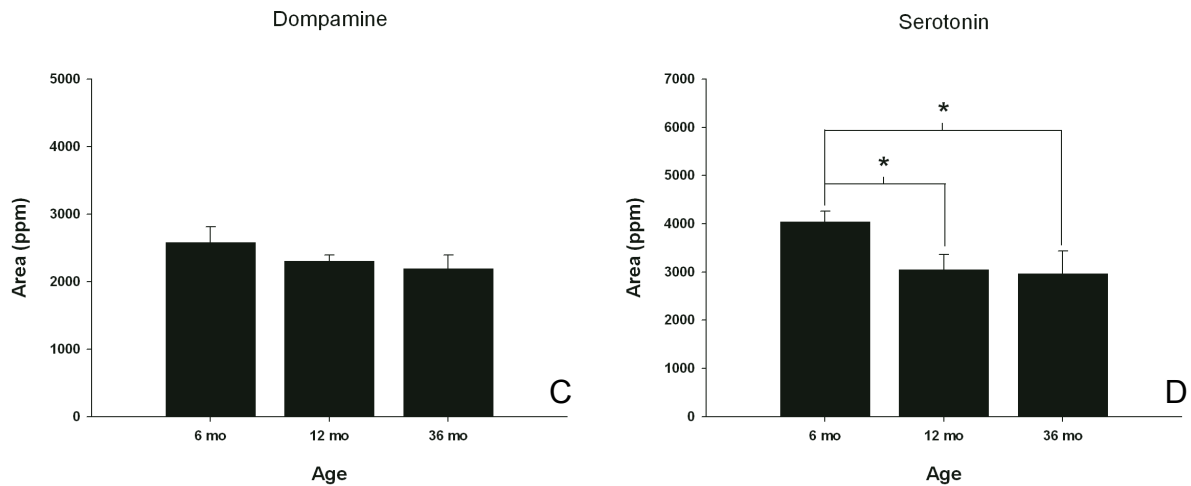


Fig. 41. Niveles de neurotransmisores en el hipocampo de *O. degus* de diferentes edades. C) Niveles de DA (partes por millón) en el hipocampo de *O. degus* de 6, 12 y 36 meses de edad (n =15). D) Niveles de 5HT (partes por millón) en el hipocampo de *O. degus* de 6, 12 y 36 meses de edad (n =15). * $p < 0.05$, respecto al grupo de *O. degus* de 6 meses de edad.

No se encontraron diferencias en los niveles de 5-HT en esta estructura entre ninguno de los grupos de diferente edad (Fig. 41E).

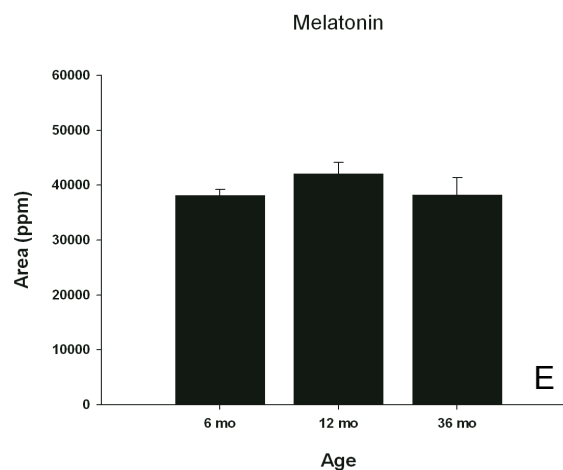


Fig. 41. Niveles de neurotransmisores en el hipocampo de *O. degus* de diferentes edades. E) Niveles de melatonina (partes por millón) en el hipocampo de *O. degus* de 6, 12 y 36 meses de edad (n =15).

5.3. Niveles de glutamato, acetilcolina, dopamina, serotonina y melatonina en el epítalamo de *O. degus* de diferentes edades (6, 12 y 36 meses)

En el epítalamo, el análisis por HPLC de los distintos compuestos en los distintos grupos de *O. degus* mostró algunas diferencias en los niveles de los diferentes compuestos (Fig. 42).

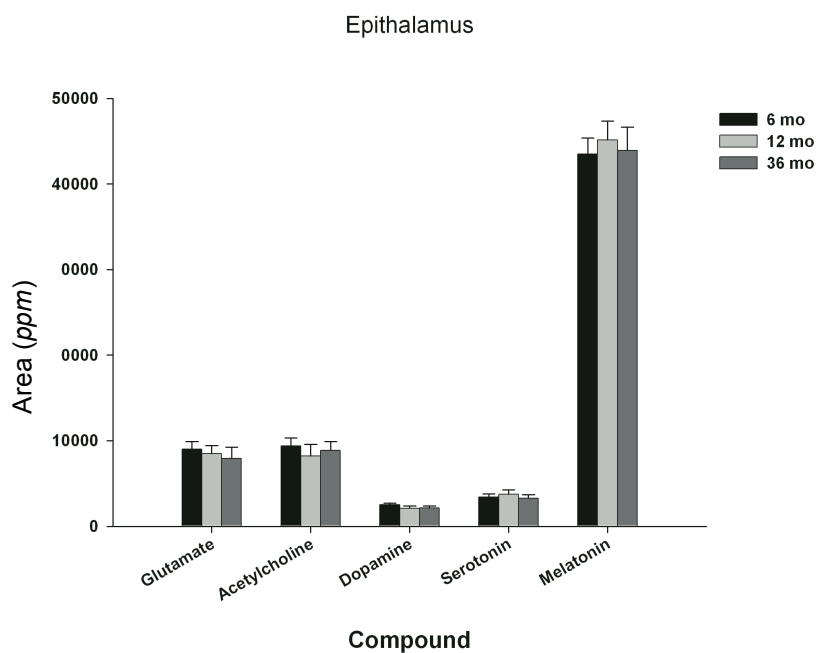


Fig. 42. Niveles de neurotransmisores en el epitálamo. Niveles de Glut, ACh, DA, 5HT y melatonina (partes por millón) en el epitálamo de las *O. degus* de diferentes edades (n = 15). * p < 0.05, ** p < 0.01, respecto de los diferentes grupos de edad.

Sin embargo, el análisis estadístico no determinó ninguna diferencia entre los distintos grupos de edad en los diferentes compuestos, aunque la cantidad de melatonina presente en el epitálamo es claramente mayor para los tres grupos de edad (Figs. 43A — E).

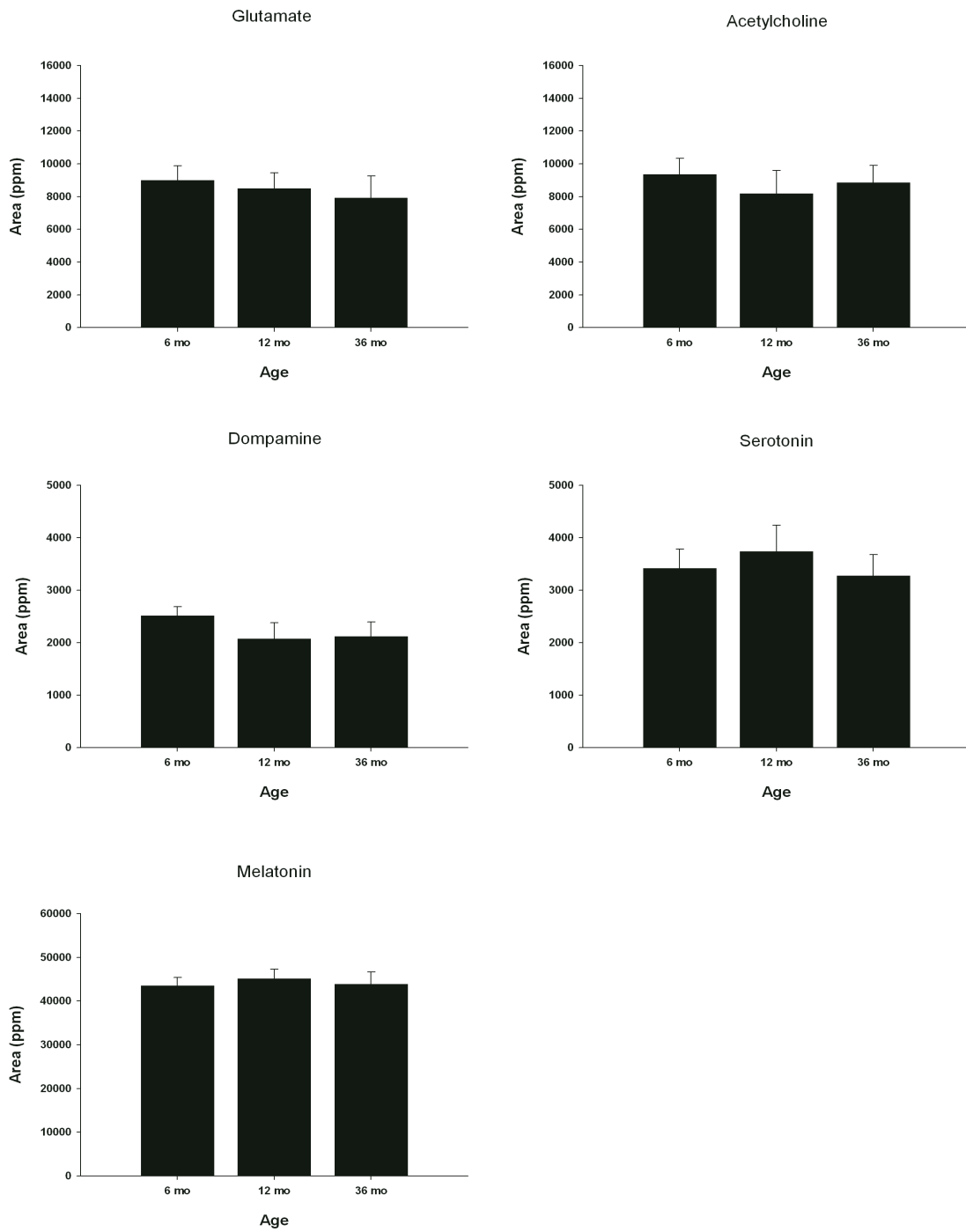


Fig. 43. Niveles de neurotransmisores en el epítalamo de *O. degus* de diferentes edades. Niveles de A) Glut, B) ACh, C) DA, D) 5HT y E) melatonina (partes por millón) en el epítalamo de las *O. degus* de 6, 12 y 36 meses (n = 15).

6. Resumen de resultados

6.1. Resultados experimentos conductuales

Radial Arm Maze y Barnes Maze

Edad	Test	Tratamiento	Variable			
			Latencia	Tiempo total	Reference Memory	Working Memory
Jóvenes	RAM	Vehículo	++	++	++	++
		Mem 10 mg/Kg				
	BM	Vehículo	++	++	++	++
		Mem 10 mg/Kg				
Viejas	RAM	Vehículo	++ §	++	++ §	++ §
		Mem 10 mg/Kg				
	BM	Vehículo	++	++	++ §	++
		Mem 10 mg/Kg				

Tabla 3. Matriz de resultados de los dos grupos de edad bajo la condición de SD en los paradigmas de RAM y BM. ++ $p < 0.01$, respecto el grupo *No SD*; § $p < 0.05$, respecto al grupo de *O. degus* jóvenes.

Novel Object Recognition

Edad	Tratamiento	Condición					
		<i>No SD</i>			<i>SD</i>		
		Familiarización	NLR	NOR	Familiarización	NLR	NOR
Jóvenes	Vehículo		++	++		##	##
	Mem 10 mg/Kg						
Viejas	Vehículo		++	++		## §	## §
	Mem 10 mg/Kg						

Tabla 4. Matriz de resultados de los dos grupos de edad en el tiempo de exploración del lugar y el objeto nuevo en paradigma de NOR. ++ $p < 0.01$, respecto al objeto familiar; ## $p < 0.01$, respecto a la condición de *No SD*; § $p < 0.05$, respecto al grupo de *O. degus* jóvenes.

6.2. Resultados HPLC

Estructura	Compuesto	Edad		
		6	12	36
Corteza frontal	Glutamato (Glut)			↑↑↑
	Acetilcolina (ACh)		↓	↓
	Dopamina (DA)			
	Serotonina (5-HT)			
	Melatonina			
Hipocampo	Glutamato (Glut)		↑	↑↑
	Acetilcolina (ACh)			
	Dopamina (DA)			
	Serotonina (5-HT)		↓	↓
	Melatonina			
Epitálamo	Glutamato (Glut)			
	Acetilcolina (ACh)			
	Dopamina (DA)			
	Serotonina (5-HT)			
	Melatonina			

Tabla 5. Diferencias en los niveles de diferentes compuestos en corteza frontal, hipocampo y epitálamo de *O. degus* de 6, 12 y 36 meses de edad. En corteza frontal, + p < 0.05, respecto al grupo de 6 meses; ++ p < 0.01, respecto al grupo de 12 meses. En hipocampo, ↑/↓ p < 0.05, ↓↓/↑↑ p < 0.01, respecto al grupo de 6 meses.

En conjunto, los resultados obtenidos hasta el momento sugieren que existe una relación entre la edad, el estrés y la memoria, y que estos factores se ven también afectados por unas alteraciones del sueño que parecen ser más intensas en la edad avanzada, como se refleja en los experimentos conductuales. Además, cabe pensar que estos procesos están afectando a su vez a los niveles de neurotransmisores, atendiendo a las diferencias encontradas en esta tesis y a la capacidad de la memantina, un fármaco antagonista de los receptores NMDA de Glut para recuperar en los grupos con privación de sueño unos niveles de ejecución similares a los mostrados por los animales control.

DISCUSIÓN

Este trabajo analiza la relación entre la privación de sueño y el envejecimiento, el posible efecto aditivo de un factor sobre el otro y el papel del estrés como mediador implicado en ambos procesos, en relación al aprendizaje y la memoria. Además, explora la acción de la memantina sobre estos dominios cognitivos, tanto en un estado normal como en condiciones de deterioro cognitivo provocado por la privación de sueño. Las hipótesis planteadas dieron lugar a una completa serie de experimentos que han aportado múltiples datos y resultados que, a continuación, se intentarán argumentar dentro del marco de los objetivos planteados.

1. Discusión del método

1.1. Características de los animales

Los animales utilizados en este trabajo son hembras de edades comprendidas entre 6 y 48 meses. Es sabido que la prevalencia de la EA es mayor en mujeres (Baum, 2005), por lo que parecía oportuno centrar el trabajo en hembras para una mayor relevancia translacional. La edad de los animales se escogió siguiendo un envejecimiento exponencial a partir de los 6 meses desde el nacimiento, momento en que se les deja de considerar crías (Lee, 2004). Dado que uno de los objetivos de esta tesis era comprobar el efecto de la edad en las distintas condiciones experimentales, todos los experimentos se realizaron en grupos de *O. degus* de edades distintas. Dada la escasa investigación en el campo del deterioro cognitivo asociado a la edad que se ha realizado en este roedor hasta la fecha, los grupos de edad se escogieron en base a estudios previos (Inestrosa y cols., 2005). El grupo de mayor edad es de 48 meses, ya que a pesar de que la esperanza de vida de estos animales puede llegar hasta los 9 años, a partir de los 4 se considera que son animales añosos (Lee, 2004; Inestrosa et al., 2005).

1.2. Tipos de test

Existe mucho debate en torno a si es posible evaluar la memoria de referencia en animales, dado que según varios autores es necesario haber desarrollado un autoconcepto, una consciencia y la habilidad para percibir el paso del tiempo, requerimientos de dudosa competencia entre mamíferos no humanos (Ferbinteanu y cols., 2006). Sin embargo, en los últimos años la investigación ha aportado resultados que sugieren un tipo de memoria similar en roedores y otras especies (Crystal, 2010). Estos experimentos se basan en paradigmas que exigen que el animal recuerde una serie de elementos considerados parte de la memoria episódica («qué» y «dónde»), así como el uso de esa información para lograr una respuesta orientada a un objetivo concreto.

A la hora de evaluar la memoria y el aprendizaje en los diferentes modelos animales, existen multitud de paradigmas validados a lo largo de los años (Sharma y cols., 2010). Entre los más utilizados para el aprendizaje y la memoria espacial se encuentra el RAM, descrito y popularizado hace más de 30 años (Olton y Samuelson, 1976). En este tiempo, el paradigma ha visto muchas y muy variadas versiones (ocho brazos, doce brazos, veinticuatro brazos...), cada una con el objetivo de mejorar algún aspecto de la versión original, o siendo modificada para aumentar la validez del laberinto y ser más específico en la evaluación de distintos tipos de memoria. En este sentido, Jarrad (1983) desarrolló una variante que permite evaluar tanto la memoria de referencia espacial como la memoria de trabajo. El mismo modelo es el que se ha seleccionado para esta tesis. Con la incorporación de cuatro de los ocho brazos reforzados, un entrenamiento a lo largo de varios días y atendiendo a los criterios detallados en las páginas 68 y 69 (cuantificar como error de memoria de trabajo la visita repetida a un brazo durante una sesión y como error de referencia la visita a un brazo no reforzado), se puede medir ambos tipos de memoria (Jarrard, 1983; Gresack y Frick, 2003). A día de hoy, no ha sido posible encontrar ningún trabajo en la literatura que evalúe la memoria y el aprendizaje en el *O. degus*

mediante este paradigma. Así pues, consideramos que utilizarlo en un contexto como el desarrollo de este estudio era interesante no sólo para comprobar la viabilidad de utilizar este roedor en este test, sino para validarlo como una alternativa más en el estudio preclínico de ambos procesos psicológicos.

El BM resulta otro de los paradigmas más extendidos en la investigación básica de situaciones que reproducen déficit cognitivos en modelo animal (Stewart y cols., 2011). Sin embargo, es importante hacer hincapié en que su principal aplicación siempre ha sido la exploración de la memoria de referencia espacial (Seeger y cols., 2004), en tanto que se ha demostrado que la presencia de claves contextuales externas facilita la ejecución en esta prueba (Koopmans y cols., 2003; Patil y cols., 2009). Se ha demostrado que roedores con daño en el hipocampo muestran una ejecución muy pobre en este paradigma (Patil y cols., 2009). Teniendo en cuenta el papel del hipocampo en este tipo de memoria, esos resultados son coherentes con la defensa de la naturaleza espacial del test. Otro aspecto que resultó decisivo para la inclusión de este paradigma en el conjunto experimental de la tesis fue que de entre la escasa investigación conductual realizada hasta la fecha en el *O. degus*, el BM es uno de los pocos paradigmas que han sido validados en este modelo para la evaluación de la memoria de referencia y la memoria de trabajo (Popovic y cols., 2010). Los experimentos realizados en esta tesis apoyan la idea de que el *O. degus* resulta en este contexto un modelo tan válido como lo son otros roedores y mamíferos.

Respecto a la elección del NOR, varias fueron las consideraciones para incluirlo como parte del trabajo. En primer lugar, es importante mencionar que la esencia de los modelos translacionales de deterioro cognitivo descansan sobre la capacidad de los diferentes test para evaluar de forma efectiva la manera en que los sujetos son capaces de reconocer ciertos estímulos, ya sean estos objetos, figuras, imágenes o brazos de un laberinto (Burke y cols., 2010). En este sentido, la tarea de NOR no está basada en el reforzamiento (como puede ser

encontrar una salida, o un pedazo de comida), sino en la tendencia natural de los roedores por explorar los objetos y entornos que les son novedosos (Ennaceur y Delacour, 1988). En segundo lugar, al igual que ocurre con el BM, la utilización del *O. degus* en este paradigma se ha implementado recientemente (Ardiles y cols., 2012), lo cual proporciona un punto de partida respaldado por la literatura y refuerza la hipótesis inicial de incluir este test en el estudio. En este sentido, para esta tesis doctoral se han integrado dentro del mismo procedimiento de NOR dos tareas, combinando un test de reconocimiento de lugar y el test de reconocimiento de objeto. Tanto el test de reconocimiento de lugar como el de reconocimiento de objeto apuntan a una diferencia en la sensibilidad de los sujetos más mayores a la privación de sueño. Los experimentos llevados a cabo con la tarea NOR contaban con dos grupos de *O. degus* de diferentes edades. El buen funcionamiento del hipocampo es necesario tanto para una memoria espacial intacta como para un correcto reconocimiento de los objetos. Así pues, en caso de que esta estructura sufra algún tipo de daño, se podría esperar la aparición de algún tipo de déficit de memoria, de gravedad variable (Broadbent y cols. 2010). Se ha sugerido que la consolidación de la información y la creación de los esquemas mentales basados en las características espaciales y contextuales de los objetos tiene lugar durante el desarrollo de esta tarea (Oliveira y cols., 2010). Es más, se sabe que la tasa de neurogénesis del hipocampo está relacionada con la memoria espacial (Sarkisyan y Hedlund, 2009), siendo el hipocampo el responsable directo de la memoria de reconocimiento de objeto (Reger y cols., 2009; Goulart y cols., 2010).

1.3. Privación de sueño

Entre los paradigmas conductuales disponibles para reproducir un deterioro cognitivo transitorio, la privación de sueño ha demostrado repetidamente ser un método de gran efectividad para inducir problemas de memoria, tanto en animales (Alhaider y cols., 2011; Aleisa y cols., 2011b) como en humanos (McEwen, 2006; Alzoubi y cols., 2012). El

procedimiento de privación de sueño se puede clasificar en dos variantes: una, que provoca un estado de *arousal* elevado, bien causado por altos niveles de estrés (McDermott y cols., 2006) o por la exposición a entornos poco familiares (Kopp y cols., 2006); y otra variante, que impide que el animal caiga dormido mediante estimulación suave, conocida como *gentle-handling* (Schwierinpa y cols., 1998; Schwartz y Mong, 2011). Se ha descrito anteriormente que esta variante es capaz de producir problemas transitorios en la memoria (Graves y cols., 2003; McEwen, 2006). Dado que la hipótesis principal de este trabajo es que el deterioro cognitivo inducido por la privación de sueño está especialmente facilitado por la elevación en los niveles de corticosterona directamente derivados de un proceso estresante, minimizar las fuentes de estrés externas al procedimiento en sí parecía la opción más acertada. Además, la privación de sueño ha sido probada con anterioridad también en el *O. degus* (Kas y Edgar, 1999), aunque no existe ningún trabajo en el que se estudie un efecto en la memoria utilizando este roedor.

El mecanismo exacto por el cual la privación de sueño ejerce su efecto no se conoce completamente, aunque se han sugerido varias hipótesis (Ming y Song, 2005; Meerlo y cols., 2009). Existen trabajos que apoyan la idea de que en modelos animales, la privación de sueño es capaz de causar atrofia en las neuronas del hipocampo y otras estructuras cerebrales implicadas en distintos dominios cognitivos, como la memoria y la atención (McEwen y Chattarji, 2004). De cualquier modo, está ampliamente documentado que este paradigma tiene consecuencias en la formación, expresión y recuperación de la memoria (Walker, 2009; Dodds y cols., 2011; Jugovac y Caballero, 2011), y que produce una consolidación deficiente tanto en la memoria procedimental como declarativa, que es en la que este trabajo se ha centrado (Mu y cols., 2005; Jugovac y Caballero, 2011). Además, se ha demostrado que la privación de sueño por *gentle-handling* es igualmente capaz de generar un deterioro a corto plazo de la memoria (Alhaider y cols., 2011; Aleisa y cols., 2011). En este estudio se decidió realizar una privación de sueño total, impidiendo dormir al animal durante las doce horas de su ciclo de oscuridad. La

mayoría de trabajos de experimentación preclínica y privación de sueño han utilizado roedores nocturnos, principalmente ratones y ratas, encontrándose en ocasiones cierta discrepancia entre las distintas posibilidades para fraccionar el sueño, impidiendo a los animales dormir las primeras o últimas seis horas del ciclo (Hagewoud y cols., 2010). Dado que el *O. degus* es un modelo nuevo para el estudio de los efectos conductuales de la privación de sueño, se decidió utilizar la privación de sueño total, asegurando así que el animal no tuviera acceso al periodo de consolidación tras las sesiones de entrenamiento y eliminando la fuente de controversia sobre el número de horas y el la fracción del ciclo en que se lleva a cabo la privación.

2. Discusión de los resultados

2.1. Efecto de la edad y la privación de sueño en la memoria

La primera serie de experimentos tenían como objetivo la evaluación del impacto de la privación de sueño en diferentes paradigmas que evalúan diferentes tipos de memoria en un modelo animal recientemente introducido en el estudio preclínico de las enfermedades neurodegenerativas y alteraciones cognitivas asociadas a la edad, el *O. degus*. Para ello, se entrenó en el RAM, BM y NOR a dos grupos de edades diferentes (jóvenes y viejas), y se les realizó un test bajo distintas condiciones de sueño: sueño normal y privación de sueño total mediante *gente handling*. A continuación se discuten los resultados obtenidos en los experimentos realizados con *O. degus* jóvenes.

Para la RAM se tuvieron en consideración cuatro variables para evaluar el deterioro cognitivo: latencia, tiempo total, errores de memoria de referencia y errores de memoria de trabajo. Los resultados muestran un claro efecto del aprendizaje de la tarea, manifestado por la reducción progresiva general a lo largo de las sesiones de entrenamiento tanto en la latencia como en el tiempo total. Este aprendizaje también se observa al comparar el número de errores

de memoria de referencia y memoria de trabajo a lo largo de los 7 días de entrenamiento. Estos resultados son coherentes con trabajos previos que muestran que la privación de sueño tiene un efecto deletéreo sobre la memoria evaluada mediante este paradigma (Alhaider y cols., 2011). No obstante, al comparar las diferentes condiciones experimentales se observa que la privación de sueño provoca un deterioro en la ejecución de la tarea, tal y como se muestra por el mayor tiempo que despliegan los animales para entrar en los brazos o terminar el test, así como por el mayor número de errores de memoria de referencia y memoria de trabajo cometidos durante la sesión de test.

Similares resultados ocurren en los experimentos con la BM. Los animales muestran un buen aprendizaje de la tarea, describiendo una clara curva de aprendizaje a lo largo de los días; la ejecución de los animales mejora tanto la latencia de llegada al agujero de escape, como el tiempo total, los errores de referencia espacial y los errores de memoria de trabajo. El efecto del aprendizaje es más llamativo si cabe, ya que el test se realiza siete días después de la última sesión de entrenamiento. En este sentido, los resultados indican que la información adquirida es recuperada de forma efectiva en la sesión de test, demostrando que la memoria de los animales, bajo condiciones de sueño normal, resulta intacta. Estos resultados son comparables a los obtenidos por Popovic y cols. (2010), los cuales muestran un buen aprendizaje de la tarea por parte del *O. degus*, así como otros grupos de investigación que han utilizado este test como método para evaluar el aprendizaje y la memoria (Patil y cols., 2009). Por el contrario, el grupo sometido a privación de sueño es incapaz de recuperar la información necesaria para ejecutar la tarea de forma eficiente, tal y como indican las diferencias en las cuatro variables tenidas en cuenta: latencia, tiempo total, errores de memoria de referencia espacial y errores de memoria de trabajo.

Los resultados en la tarea de NOR están en la línea de los anteriores experimentos. El tiempo que los animales dedicaron a la exploración tanto del lugar nuevo como del objeto

nuevo se vio claramente comprometido en el grupo que fue sometido a la privación de sueño, en comparación con el grupo de *O. degus* en una condición de sueño normal. Esto sugiere que tanto la memoria para el reconocimiento de lugar como para el reconocimiento de objeto se encontraba, de alguna forma, inaccesible en aquellos animales que no pudieron consolidar la información durante la fase de sueño. Por el contrario, el tiempo de exploración de las *O. degus* que no fueron sometidos a privación de sueño fue significativamente más elevado, lo que sugiere que su memoria permanecía intacta, como está generalmente aceptado en la comunidad científica en lo que se refiere a la utilización de este test (Patil y cols., 2009; Wang y cols., 2009; Antunes y Biala, 2011). En este punto, es importante señalar que en el paradigma de NOR utilizado en este trabajo existe un primer ensayo previo a las tareas de reconocimiento de lugar y de objeto, y que el tiempo de exploración durante este ensayo no mostraba diferencias significativas entre los grupos sometidos a privación de sueño y los de sueño normal. Esto resulta relevante, en tanto que se podría argumentar que el menor tiempo de exploración se debe a una menor actividad de los animales, debido, por ejemplo, a que están cansados. Como otros autores han sugerido en similares condiciones, que no se encuentren diferencias entre los grupos en el tiempo de exploración durante este ensayo demuestra que la falta de exploración del lugar nuevo y el objeto nuevo no es debido a una limitación locomotora, sino a la incapacidad para recuperar la información que clasifica los estímulos como familiares (Ennaceur y cols., 2010; Binder y cols., 2012).

Sin embargo, estos resultados estarían incompletos dentro del marco teórico de esta tesis si no se interpreta el efecto de la privación de sueño sobre el grupo de las *O. degus* viejas. En este sentido, es interesante remarcar que, en términos generales, las *O. degus* viejas obtienen resultados similares a los jóvenes en todos los paradigmas utilizados para la evaluación del aprendizaje y la memoria; ambos grupos, jóvenes y viejos, aprenden y ejecutan las tareas de forma similar, y no se hallan diferencias entre los grupos en condiciones

normales. Por su parte, las *O. degus* viejas también se ven influenciados por la privación de sueño, viéndose claramente en los resultados cómo este procedimiento afecta, al igual que a los jóvenes, a la capacidad para recuperar la información en las sesiones de test, lo que sugiere que los sujetos de mayor edad también son igualmente vulnerables a las consecuencias que provoca esta condición. No obstante, un análisis más profundo del efecto de la edad y la condición de sueño revela que, aunque afectados tanto los animales jóvenes como los viejos, el impacto de la privación de sueño es mayor en estos últimos. Este resultado es especialmente llamativo, ya que parece ir en contra de lo que cabría esperar en un principio. Son varios los trabajos que señalan una diferencia en la memoria de sujetos jóvenes y añosos (Pilz y cols., 2011). Es más, en uno de los escasos trabajos con *O. degus* viejos, Ardiles y colaboradores (2012) muestran que los animales añosos no son capaces de realizar correctamente la tarea de reconocimiento de objeto, pero los resultados obtenidos en este estudio sugieren lo contrario. Merece la pena señalar las diferencias procedimentales y metodológicas de ambos procesos: mientras que el estudio de Ardiles utiliza un campo abierto sin periodo de habituación o familiarización, el protocolo seguido en este estudio se realiza en la propia caja del animal y tras un periodo de familiarización. Una posible explicación para esta diferencia es que el test realizado en un entorno conocido permita centrar la atención en la novedad de los objetos presentados. Aún así, lo que resulta claro es que los sujetos de mayor edad parecen ser más vulnerables a los efectos derivados de la privación de sueño, lo que sería coherente con lo observado tanto en la práctica clínica (Crowley, 2011) como en otros trabajos con modelo animal (Descamps y Cespuglio, 2010), donde los sujetos de mayor edad presentan problemas de sueño mayores (Bombois y cols., 2010). En los próximos apartados, se intentarán discutir posibles causas para esta diferencia.

2.2. Discusión de los resultados obtenidos por HPLC

Los resultados obtenidos del análisis por HPLC arrojan diferencias en los niveles de los diferentes neurotransmisores encontrados en corteza frontal, hipocampo y epítalamo. Los resultados entre los distintos grupos de edad parecen arrojar algunas diferencias significativas en dos de las tres estructuras: corteza frontal e hipocampo, respecto a los niveles de los diferentes compuestos. A continuación se discuten los resultados obtenidos de cada neurotransmisor analizado.

Glutamato

A pesar de que existe cierta controversia en los resultados encontrados en diferentes especies animales, es generalmente aceptado que el envejecimiento viene acompañado por una reducción de los receptores glutamatérgicos en la corteza frontal y el hipocampo (Segovia y cols., 2001). Varios estudios han demostrado que tanto los diferentes subtipos de receptores ionotrópicos como los metabotrópicos se ven disminuidos en función de la edad (Segovia y cols., 2001; Walton y Dodd, 2007). Por otra parte, se sabe que junto a la pérdida neuronal, con la edad también va asociada una reducción del número de astrocitos (Takanashi y cols., 2002; Walton y Dodd, 2007), células fundamentales para el equilibrio de la transmisión glutamatérgica, en tanto que son parte activa en el ciclo de regulación de Glut. La reducción en el número de estas células influye directamente en la cantidad de Glut extracelular, aumentando sus niveles y facilitando fenómenos de excitotoxicidad (Walton y Dodd, 2007).

La relación entre excitotoxicidad y deterioro cognitivo es bien conocida. Una exposición prolongada a niveles altos de Glut extracelular provoca que se mantenga la despolarización de la membrana celular, lo que origina un desequilibrio iónico en la neurona que lleva a la muerte de la misma (Walton y Dodd, 2007). Se ha demostrado que la excitotoxicidad glutamatérgica resulta determinante en el deterioro funcional observado en multitud de trastornos, entre los

cuales se cuenta la EA (Tannenberg y cols., 2004). Concretamente, se ha sugerido que uno de los factores más relevantes de esta excitotoxicidad asociada a la edad es el desequilibrio en el ciclo Glut-glutamina protagonizado por los astrocitos, dado que se ha observado que esta alteración puede aparecer en las etapas más tempranas de la EA, antes incluso de que se manifiesten los déficits cognitivos asociados a la enfermedad (Walton y Dodd, 2007). Uno de los mecanismos que se han sugerido para esta relación glía-edad es que las placas neuríticas formadas durante el desarrollo de la EA interfieren con los transportadores de glutamina (Fig. 44). Esta interferencia impide la correcta recaptación de Glut en el espacio sináptico, lo que según varios estudios correlaciona positivamente con la pérdida neuronal y con el deterioro cognitivo (Masliah y cols., 1996; Tannenberg y cols., 2004; Walton y Dodd, 2007; Steele y Robinson, 2012). El exceso de Glut resultante favorecería los procesos de excitotoxicidad asociada a la edad, lo que es coherente con los altos niveles de este neurotransmisor hallados en la corteza frontal e hipocampo de las *O. degus* de más edad.

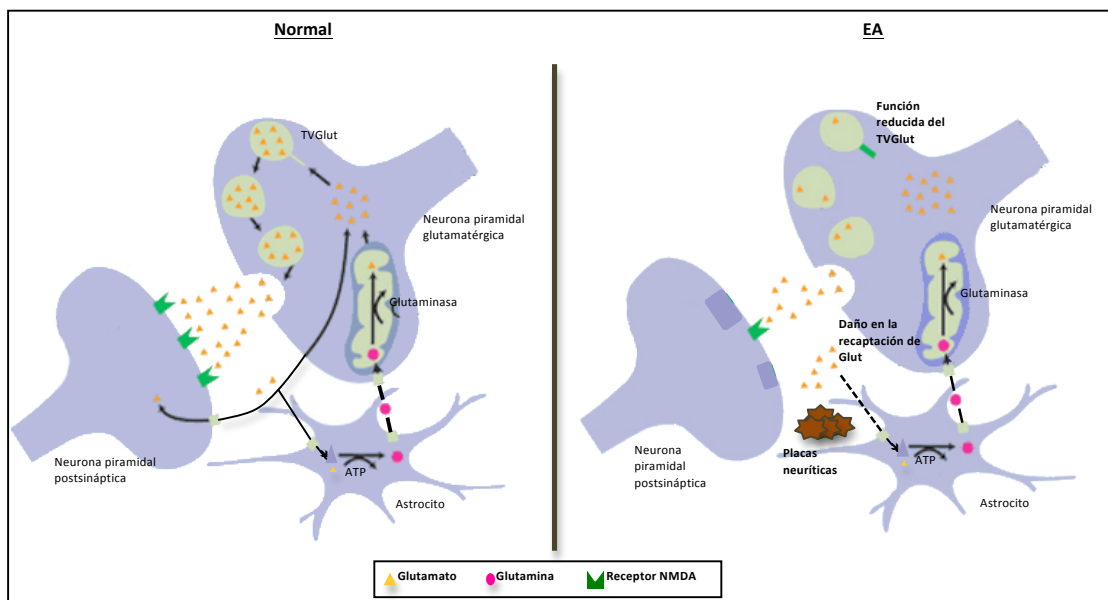


Fig 44. Ciclo Glut-glutamina en el envejecimiento fisiológico y la EA. En estado fisiológico no patológico (izq.), el Glut liberado al espacio sináptico se recupera rápidamente por las células gliales, donde se transforma en glutamina y se recicla en las neuronas. En la EA (dcha.), en cambio, las placas neuríticas interfieren en la recaptación del neurotransmisor, lo que conduce a un exceso en los niveles de Glut y a las consecuencias de este exceso (adaptado de Francis, 2005).

Una de las causas que se han sugerido para la reducción de la glutamina sintasa es el daño producido por los radicales libres derivados del estrés oxidativo (Walton y Dodd, 2007). En ratones transgénicos para la EA, Olabarria y colaboradores (2011) demostraron que junto a la estabilización de la formación de placas ocurre un deterioro en la función astrocitaria, manifestado por una reducción en la expresión de glutamina sintasa y la consiguiente capacidad para coordinar el ciclo Glut-glutamina. Esta deficiencia puede ser la causa de la alteración en la neurotransmisión glutamatérgica en la EA en los estados avanzados de la enfermedad. Estos resultados participan en una interesante línea sobre posibles aspectos determinantes para la aparición del deterioro cognitivo asociado a la edad. Dado el auge del *O. degus* como modelo para este tipo de trastornos, sería interesante en futuros estudios explorar de qué manera se producen (si se producen) estos cambios astrocitarios, así como explorar las áreas más afectadas por estas alteraciones.

Acetilcolina

A lo largo de la introducción se ha expuesto la importancia del papel de la ACh en el deterioro cognitivo asociado a la edad. La literatura acerca de la participación de este sistema en las distintas funciones que se ven afectadas en el envejecimiento (tanto normal, como patológico), es muy extensa y concreta diferentes aspectos de los cambios surgidos en este sistema con la edad (Schliebs y Arendt, 2011; Haense y cols., 2012).

A diferencia de lo que ocurre con el Glut, sí se ha demostrado que los niveles de ACh se ven reducidos en el envejecimiento (Haense y cols., 2012). Nuestros resultados van en la línea de estos hallazgos, ya que se puede observar una clara tendencia decreciente a medida que aumenta la edad en los diferentes grupos. Resulta llamativo, aún así, que el declive no termine siendo significativo en el hipocampo, incluso entre los más viejos y los más jóvenes, dado que esta estructura es una de las principales y primeras afectadas en el deterioro cognitivo asociado a la edad (Schliebs y Arendt, 2011). Una de las posibles explicaciones para

este resultado tiene que ver con que las proyecciones colinérgicas hacia el hipocampo y la corteza provienen principalmente del prosencéfalo basal y del septum (Berger-Sweeney, 2003). La relación entre los marcadores colinérgicos del hipocampo y la corteza está establecida desde hace más de 30 años, y hace tiempo que está aceptado también que la disfunción colinérgica originada en el prosencéfalo basal es causa de algunos de los déficits cognitivos observados en la EA (Haense y cols., 2012). Sin embargo, la mayoría de los estudios en los que se ha basado esta afirmación se realizaron en pacientes con estados avanzados de la enfermedad. Estudios más recientes han encontrado que los niveles de ACh en corteza e hipocampo son estables en los estadios más iniciales de la EA (Grothe y cols., 2012; Haense y cols., 2012). Más aún, se ha observado que los niveles del transportador de ACh (AChT) se encuentran aumentados en el hipocampo de algunos pacientes que presentan DCL (Grothe y cols., 2012), lo que sugiere un mecanismo de compensación en el sistema de proyecciones colinérgicas hacia esa estructura durante las etapas iniciales del proceso neurodegenerativo. Así, la reducción en la síntesis de ACh observada durante el envejecimiento es significativa en las últimas etapas de la EA y en la senectud avanzada, no hallándose diferencias en la actividad del AChT en sujetos con DCL o en etapas iniciales de la EA (Davis y cols., 1999; Tiraboschi y cols., 2000). La presencia de AChT es una de las formas más fiables de conocer la actividad de la ACh (Gsell y cols., 2004). Dado que la reducción en la actividad y niveles de ACh es un proceso que acompaña el declive presente en el envejecimiento, quizá la progresión sea más gradual, pudiéndose ver diferencias a partir de una edad que no está representada en los grupos de animales seleccionados para los análisis bioquímicos realizados en este trabajo.

Dopamina

El papel de la DA en el deterioro cognitivo asociado a la edad ha sido foco de estudio desde hace varios años. Sin embargo, existe controversia acerca de los cambios que se producen en este sistema durante el envejecimiento. El papel de la DA en la EA y el deterioro

cognitivo asociado a la edad se ha suscrito principalmente a dos regiones muy concretas: la región ventrolateral y dorsolateral de la corteza prefrontal (Nyberg y Bäckman, 2010). Además, se ha demostrado que la actividad dopaminérgica y la ruta mesocorticolímbica son dos de los principales moduladores de la función ejecutiva (Podell y cols., 2012). Así pues, se ha sugerido que afectando a la integridad de la función de la red mesocorticoestriatal, la insuficiente actividad moduladora de la DA puede jugar un papel importante en el deterioro cognitivo asociado a la edad (Podell y cols., 2012). Dado que la participación de la corteza prefrontal en la memoria de trabajo está bien establecida, los déficits asociados a la edad en este tipo de memoria se han atribuido tradicionalmente a cambios estructurales y funcionales en esta región. Sin embargo, el sentido de las diferencias en la activación parece ser debido a múltiples factores, como la carga de demanda, el desempeño en la tarea y limitaciones en la capacidad (Nagel y cols., 2009; Nyberg y cols., 2009).

Un dato interesante es el aumento en la densidad de terminaciones dopaminérgicas en la corteza frontal de ratones envejecidos que no presentan déficit cognitivo asociado a la edad (Klostermann y cols., 2012). Y aunque todavía no se han establecido claramente la consecuencias fisiológicas y conductuales de esta observación, se ha sugerido que este cambio es el resultado de un proceso adaptativo para ayudar a preservar el estado cognitivo en estos animales. Esto se puede relacionar con la reducción colinérgica, dadas las conversaciones cruzadas que existen entre ambos sistemas en múltiples estructuras cerebrales (Aalto y cols., 2005; Millan y cols., 2007). Se ha planteado la posibilidad de que el incremento de las terminaciones dopaminérgicas en la corteza prefrontal aumente con la edad de forma continuada durante el envejecimiento (Allard y cols., 2011), lo que podría ser parte de la explicación de por qué algunos sujetos presentan una mayor protección frente al deterioro cognitivo que otros.

Se ha puesto de manifiesto la importancia de las proyecciones dopaminérgicas mesocorticales en el control de las interacciones entre las conductas mediadas por la actividad del hipocampo y la corteza prefrontal (Goto y Grace, 2008). Tanto es así que se ha atribuido a las alteraciones en esta vía gran parte de la causa del deterioro cognitivo en otros trastornos neurodegenerativos como la enfermedad de Parkinson o la esquizofrenia (Mattay y cols., 2002; Allar y cols., 2011). En el caso particular de esta tesis, encontramos que los niveles de DA no varían de forma significativa en los grupos de diferentes edades. Esto se puede explicar por diferentes motivos. En primer lugar, en relación a lo explicado anteriormente, puede ser que exista un mantenimiento en los niveles de producción de DA, como resultado de un aumento de la neuroplasticidad de los terminales dopaminérgicos (regulación a la alta del número de receptores). La inespecificidad de las áreas frontales seleccionadas puede explicar los resultados respecto a este neuromodulador. A este respecto, la exploración de otras regiones como el estriado podría clarificar los cambios que con la edad afectan a este sistema.

En segundo lugar, la falta de diferencias significativas en los niveles de DA hallados en esta tesis se extiende no sólo a la corteza frontal, sino también al hipocampo. Los resultados obtenidos por algunos trabajos sobre la liberación de DA en el hipocampo facilitan la comprensión sobre esta posible falta de diferencias. Existe evidencia de una liberación de DA en hipocampo durante el desempeño de tareas con carga atencional y de memoria de trabajo (Aalto y cols., 2005; Lisman y cols., 2011), sin embargo, el aumento en la liberación de DA que afecta a estos procesos se produce de forma aguda (Chowdhury y cols., 2012). Las muestras para la determinación de los niveles de DA se recogieron una vez las tareas habían sido finalizadas, siendo posible la vuelta a los niveles basales normales en el momento de la extracción. Esto explicaría por qué no se haya detectado diferencias en los niveles hipocampales de DA.

Serotonina

Estudios clínicos y preclínicos han llamado la atención sobre el papel de la 5-HT y sus receptores en diferentes aspectos de la disfunción cognitiva, particularmente en los déficits de aprendizaje y empobrecimiento de la memoria (Sumiyoshi y cols., 2007; Xu y cols., 2012). Se ha demostrado que la densidad de receptores de 5-HT 5-HT_{1A} se correlaciona con el deterioro cognitivo observado en pacientes con EA (Lai y cols., 2002). Más concretamente, se observó una reducción de la densidad de estos receptores en la corteza frontal de pacientes con EA y bajas puntuaciones en el test cognitivo Minimental (Garcia-Alloza y cols., 2004). Estos hallazgos plantean la posibilidad de que la interacción entre el sistema serotoninérgico y el deterioro cognitivo sea especialmente significativa en el declive asociado a la edad. Sin embargo, existe controversia a este respecto. Estudios en ratas señalan que la síntesis de 5-HT no se ve alterada por la edad (Rodríguez-Gomez y cols., 1995), mientras que otros aseguran que sí existe una disminución significativa en regiones como la corteza prefrontal o el hipocampo en ratas en edad muy avanzada (Birthelmer y cols., 2003; Mizoguchi y cols., 2010). Sin embargo, estudios realizados en modelos animales y pacientes con EA sí muestran una disminución significativa, tanto en el número de receptores como en la síntesis de 5-HT (Garcia-Alloza y cols., 2005; Bowen y cols., 2008).

Los resultados obtenidos en el análisis por HPLC en esta tesis muestran diferencias significativas en los niveles de 5-HT en hipocampo. El análisis cromatográfico desvela que los animales más jóvenes tienen un mayor nivel de este neurotransmisor presente en esta estructura, y que el declive tanto en el hipocampo como en la corteza frontal no es excesivamente significativo. Esto sería coherente con los datos previos que aseguran una reducción en animales muy añosos, y respecto a la memoria, con varios estudios que hallan una correlación negativa entre este dominio cognitivo y la unión de 5-HT a los receptores del hipocampo (Yasuno y cols., 2003). Sin embargo, hay que tener en cuenta que los estudios de

referencia se realizaron en ratas, y que este es el primer trabajo que describe los niveles de distintos neurotransmisores en el *O. degus*. La disminución de 5-HT asociada a la edad en *O. degus* podría ser un argumento a favor de este roedor como modelo válido para la EA, teniendo en cuenta los estudios en humanos y otros roedores, y el diferente perfil de este neurotransmisor en el envejecimiento normal y la patología de Alzheimer (Rodríguez y cols., 2012).

Melatonina

En todas las muestras se han encontrado niveles de melatonina cerebral significativamente superiores a los de otras sustancias en las estructuras analizadas. Sin embargo, puede explicarse teniendo en cuenta dos factores: uno, el momento del sacrificio de los animales, y dos, la naturaleza crepuscular del *O. degus*. Respecto al primer punto, como se ha detallado en el apartado de materiales y métodos, el sacrificio y extracción de cerebro se realizó por la mañana, a la misma hora en que había sido programada anteriormente la extracción de sangre para los experimentos mediante ELISA. La melatonina es una hormona que se segrega en los momentos previos al inicio del ciclo de sueño, y disminuye rápidamente en el momento en que comienza el periodo de vigilia. Puede resultar, pues, confuso, que los niveles se encuentren tan altos al inicio de la mañana, teniendo en cuenta que el *O. degus* está catalogado como un roedor diurno, principalmente. Lo que lleva al segundo punto. Aún caracterizado como un roedor diurno, un análisis en profundidad de la conducta circadiana de este animal permite establecer una delimitación más fina, siendo que diversos trabajos en cronobiología consideran más apropiado hablar del carácter crepuscular del *O. degus* (Kas y Edgar, 1998). Siendo así, esperar que a la hora del sacrificio los niveles de melatonina estuvieran en sus mínimos podría ser una interpretación no del todo acertada. Aún así, sería lógico pensar que, aún no estando en sus niveles mínimos, la actividad de la melatonina fuera

menor. Ante este resultado, no se nos ocurre ninguna explicación más que un posible error metodológico cometido a la hora de preparar el tejido para el análisis por cromatografía.

2.3. Efecto de memantina sobre la edad y la privación de sueño

Una de las hipótesis de este trabajo era la capacidad de la memantina para prevenir los efectos nocivos de la privación de sueño sobre la recuperación de información. Para ello se sometió a los animales a los mismos procesos de entrenamiento y tareas, administrando una dosis intraperitoneal de vehículo o de 10 mg/Kg del fármaco al inicio de la fase de privación de sueño. Los resultados obtenidos en cada uno de los test se discuten a continuación.

En el RAM se replican los resultados obtenidos en los experimentos realizados sin memantina, en los que el grupo con privación de sueño aumenta de forma significativa el tiempo de entrada en uno de los brazos, tanto en los animales jóvenes como viejos, siendo en estos últimos incluso aún mayor la diferencia con los jóvenes. El tratamiento con memantina, sin embargo, logra eliminar las diferencias entre los grupos, reduciendo significativamente el tiempo de latencia respecto a la inyección de salino hasta alcanzar en ambos grupos de edad tiempos similares a los obtenidos en condiciones normales de sueño. Lo mismo ocurre cuando se observa la medida del tiempo total del ensayo. La dosis seleccionada consigue reducir el tiempo de duración del test a niveles comparables a los controles. Sobre los errores de memoria de referencia la memantina tiene un efecto similar: los animales tratados previamente a la privación de sueño el último día de entrenamiento, no muestran el día del test un número de errores diferente a los cometidos por sus respectivos grupos de edad en condiciones normales. Respecto a la memoria de trabajo, cabe decir que a diferencia del grupo de *O. degus* viejos, el efecto sobre los animales jóvenes parecen limitado, dado que el número de errores de estos últimos no se ve reducido de forma significativa. No obstante, observando la representación de los resultados la tendencia es clara.

Estos resultados indican que la memantina, administrada en las condiciones escogidas, es eficaz para prevenir el aumento de la latencia de entrada en los brazos del laberinto, el aumento del tiempo total para finalizar la tarea, y el aumento del número de errores de memoria en este paradigma.

Los resultados del test de BM tras la administración de memantina confirman los obtenidos previamente con el RAM. La latencia de los animales en condiciones de sueño normal y de privación de sueño es similar tras la administración de 10 mg/Kg de memantina. Este tiempo es similar al obtenido por los animales en la condición de sueño normal y salino, pero significativamente menor al de este mismo grupo en condiciones de privación de sueño. El mismo resultado se obtuvo al analizar el tiempo total del ensayo. Los animales, tanto jóvenes como viejos, que fueron sometidos a privación de sueño sin tratamiento muestran un tiempo significativamente superior al obtenido tanto por los no tratados y condición de sueño normal como por los tratados con memantina en ambas condiciones.

El número de errores de memoria de referencia y de memoria de trabajo medidos con este paradigma también se ven afectados por el tratamiento con memantina. En este caso, al igual que lo sucedido con la latencia y el tiempo total, la ejecución en ambas variables mejora significativamente. Los resultados muestran claramente que el número de ambos tipos de errores es considerablemente menor en el grupo al que se administró la memantina. La cantidad de errores (y el tipo, de referencia y de trabajo) cometidos por las *O. degus* tratadas con memantina en ambas condiciones y las no tratadas en condición de sueño normal no es estadísticamente diferente. Sí lo es, sin embargo, el obtenido por el grupo sin tratamiento y privación de sueño. Estos resultados son coherentes con los obtenidos en el test de RAM y sugieren una relación entre las alteraciones del sueño, la memoria y el efecto que la memantina puede estar ejerciendo en los procesos implicados. Estos resultados corroboran los

obtenidos con el paradigma del RAM, apoyando la idea de la memantina como agente neuroprotector.

Sobre la tarea de NOR, tanto en el ensayo de reconocimiento de lugar como en el de reconocimiento de objeto, parece que la memantina está ejerciendo también un efecto preservador de la memoria. Mientras que en el ensayo de familiarización no se encuentran diferencias en el tiempo de exploración de los objetos en ninguno de los grupos de las diferentes condiciones experimentales, el ensayo de NLR sí arroja diferencias significativas. El primer resultado claro es el mayor tiempo de exploración del objeto en la nueva localización, tanto por parte de las *O. degus* jóvenes como viejas. Este tiempo de exploración se ve igualado bajo condiciones de privación de sueño, pero vuelve a ser significativamente superior cuando se administra el tratamiento con memantina. El ensayo de reconocimiento de objeto presenta un patrón de exploración similar. Los animales jóvenes y viejos en condiciones de privación de sueño no reconocen el objeto nuevo como tal, lo que impide una preferencia en la exploración. No obstante, en condiciones de sueño normal y/o en la condición de privación de sueño tras la administración de memantina, el recuerdo del objeto familiar parece intacto, favoreciendo la exploración del objeto nuevo.

Aún así, a pesar de los resultados obtenidos por las diversas pruebas, se podría argumentar que la memantina no está afectando a la calidad de la memoria, sino que su acción se debe principalmente a un aumento en el componente locomotor del animal. Sin embargo, las medidas del número de errores en el RAM y el BM, así como el tiempo de exploración del ensayo de familiarización en la tarea de NOR indican que no es el componente psicomotor el principal afectado por la privación de sueño. Estos resultados indican que la memantina, administrada previamente a la privación de sueño es capaz de prevenir los efectos deletéreos que este procedimiento tiene sobre la recuperación de la información, tanto espacial, como de reconocimiento y memoria de trabajo. Asimismo, son coherentes con varios informes clínicos

en los que se describe que los pacientes tratados con este fármaco en estados avanzados de la EA mejoran significativamente su memoria de reconocimiento y estado funcional general (Collingridge y cols., 2013).

Los resultados obtenidos en las pruebas conductuales encajan con los datos obtenidos mediante cromatografía, ya que niveles bajos de 5-HT asociados a la edad facilitan indirectamente el exceso de Glut en el hipocampo y directamente en la corteza prefrontal, el antagonismo de los receptores NMDA mediante la memantina bloquearía el efecto de un exceso de Glut en la sinapsis sin estar alterando el funcionamiento de la 5-HT, explicando la mejora conductual que se observa en los animales tratados con este fármaco. La distribución de los distintos receptores de 5-HT y el papel de esta como modulador inhibitorio de las neuronas glutamatérgicas y colinérgicas se ha descrito en múltiples estudios (Carli y Samanin, 1992; King y cols., 2008). Una reducción de 5-HT asociada a la EA facilitaría un deterioro en la modulación de la liberación de Glut y ACh, posibilitando la alteración en los niveles de los distintos neurotransmisores. Por un lado, la pérdida de inhibición de las neuronas glutamatérgicas sumaría su acción a la de la pérdida de receptores glutamatérgicos asociada a la edad, aumentando los niveles extracelulares de Glut. Por otra parte, la inhibición de las neuronas colinérgicas en el hipocampo sería menor debido a una reducción mayor de 5-HT en esta estructura, lo que concuerda con mayores niveles de ACh. Contrariamente, en la corteza frontal, mayor actividad de la 5-HT provocaría una mayor inhibición de las neuronas colinérgicas, lo que estaría relacionada con la mayor disminución de ACh en esta región, lo que aumentaría los niveles de ACh y explicaría la falta de diferencias significativas en los niveles de este neurotransmisor en esta región.

2.4. Efecto de la edad, el estrés y la privación de sueño

Los resultados indican que en condiciones normales de sueño, la ejecución en la mayoría de test es similar en el grupo de *O. degus* jóvenes y viejas. Tanto en la RAM, como en

la BM y en la tarea de NOR, la ejecución se ve significativamente comprometida por la privación de sueño. Teniendo en cuenta lo expuesto en el punto anterior, es interesante acudir a la figura que presenta los niveles de corticosterona en plasma de estos animales (Fig. 36, pág. 109). Los resultados muestran que los niveles de esta hormona aumentan progresivamente con la edad, casi de manera lineal, aunque no llega a ser un aumento significativo entre los diferentes grupos de edad. Lo que sí resulta significativo, no obstante, es el aumento tras la privación de sueño. El análisis por ELISA muestra que el estrés, medido objetivamente como un aumento en los niveles de corticosterona, es mayor en los grupos sometidos a privación de sueño (de 12 y 48 meses de edad) que en condiciones de sueño normal. Es más, la diferencia de corticosterona en el grupo de *O. degus* de 48 meses no sólo resulta significativamente mayor respecto a los mismos animales en condiciones de sueño normal, sino también respecto a los animales de 12 meses que pasaron también por la privación de sueño. Esto sugiere que la edad es un factor que aumenta tanto el efecto de la privación de sueño como los niveles de estrés en el *O. degus*, relacionado el empobrecimiento en la ejecución de las tareas y convirtiéndose en un indicador indirecto del deterioro cognitivo en estos animales.

En conjunto, los resultados conductuales y bioquímicos sugieren que el empeoramiento en la ejecución de las tareas cognitivas de las *O. degus* viejas respecto a las jóvenes podría deberse a una mayor sensibilidad a las alteraciones en el ciclo normal de sueño. Esta interpretación también explica por qué bajo condiciones de sueño normal, la ejecución de ambos grupos no resulta significativamente diferente, a pesar de la diferencia en la edad. Estudios previos han demostrado que los niveles de corticosterona aumentan significativamente con la edad (Issa y cols., 1990). En este trabajo no se han podido replicar esos hallazgos. Sin embargo, hasta la fecha no hay publicaciones que describan el perfil de los diferentes marcadores (tanto corticosterona como neurotransmisores) en el *O. degus* adulto.

En este sentido, los datos obtenidos en este estudio son capaces de responder las observaciones realizadas en los experimentos conductuales de forma coherente a la hipótesis correspondiente planteada en esta tesis.

Se ha demostrado que el tiempo necesario para recuperar el peso corporal tras la supresión de la fase REM por privación de sueño puede incrementar con la edad (Koban y Stewart, 2006). Esto sugiere dos cosas: por un lado, que la privación de sueño es capaz de alterar la respuesta fisiológica además de la mera conducta del sueño; y por otro lado, que la respuesta adaptativa al estrés puede modificarse bajo estas condiciones. Tomando estos datos en conjunto, se ha sugerido que la respuesta al estrés asociada al sueño puede también estar alterada con la edad. Nuestros resultados parecen corroborar esta idea, lo que resulta coherente con los resultados de otros estudios realizados en otros modelos experimentales con preguntas relacionadas (Descamps y Cespuglio, 2010). Se sabe también que en animales envejecidos la secreción de glucocorticoides asociada al estrés tiene un efecto mayor debido a un empobrecimiento en la regulación a la baja de estos receptores (McEwen, 2007). Los resultados obtenidos en los experimentos de esta tesis parecen continuar en esa línea de evidencia, dado que los animales con niveles de glucocorticoides en plasma más elevados, resultan más sensibles al del deterioro cognitivo provocado por la privación de sueño. Existen más resultados que avalan esta relación entre los niveles de glucocorticoides y deterioro cognitivo (Pimentel-Coelho y cols., 2013; Suri y cols., 2013). La visión en conjunto de múltiples estudios acerca del tema apunta a que la actividad alterada del eje HPA en ratas envejecidas es uno de los mecanismos básicos del deterioro cognitivo asociado a la edad (Issa y cols., 1990; Bodnoff y cols., 1995). Los resultados obtenidos en esta tesis doctoral indican que la edad es un factor de sensibilización en la respuesta al estrés directamente relacionada con el deterioro cognitivo producido por las alteraciones en el sueño. Los resultados de los análisis

bioquímicos y conductuales son coherentes y apoyan esta hipótesis. Sin embargo, hay que tener en cuenta limitaciones de este estudio.

- 1) A pesar de que la privación de sueño es capaz de incrementar los niveles de corticosterona de manera significativa y de forma continuada, podría ponerse en cuestión si resulta una fuente de estrés aguda o crónica. Existe un gran volumen de evidencia que defiende el papel beneficioso del estrés agudo en los procesos de aprendizaje, relegando el efecto deletéreo a una exposición más prolongada en el tiempo (de días, o semanas).
- 2) Mientras que parece claro que el estrés crónico afecta de forma negativa a la memoria y el aprendizaje, los efectos del estrés agudo son más controvertidos. Se ha demostrado que este tipo de estrés puede tener un efecto negativo en la memoria hasta casi dos horas después de finalizar la exposición al estímulo estresante (Dorey y cols., 2012).

Este es el primer estudio realizado con el *O. degus* en un modelo de privación de sueño dentro del contexto del aprendizaje y la memoria y su deterioro asociado a la edad. La circunstancia de que no exista literatura previa, hace difícil valorar si la privación de sueño aplicada de la forma que se ha llevado a cabo en este trabajo resulta un estímulo lo suficientemente estresante como para producir efectos negativos en los procesos psicológicos evaluados aquí. A pesar de las posturas enfrentadas, para los propósitos planteados en esta tesis doctoral parece que las particularidades del estudio son válidas para defender que la privación de sueño es una fuente de estrés suficiente. No obstante, sin duda resultaría interesante continuar explorando otras posibilidades en este sentido.

2.5. Edad, sueño, neurotransmisores y estrés: una propuesta integradora

La estrecha relación entre los efectos conductuales del estrés en la memoria espacial y las alteraciones en la actividad del sistema glutamatérgico y los receptores NMDA es una de las explicaciones que se han propuesto como base de los procesos de aprendizaje y memoria (Kemp y Manahan-Vaughan, 2007; Crowe y cols., 2008). Existe amplia evidencia de que la administración de glucocorticoides bajo determinadas condiciones es capaz de alterar los procesos de potenciación a largo plazo, deteriorando el aprendizaje (Czakoff y cols., 2010). Y se ha sugerido que la dificultad que provoca la corticosterona para recuperar la información de la memoria se debe a la inducción de una DLP dependiente del GluN2B, un subtipo de receptor NMDA (Czakoff y cols., 2010). Es más, se ha demostrado que la administración de un antagonista de los receptores NMDA previamente a la administración esta hormona bloquea la aparición del déficit de memoria causado por el estrés (Collingridge y cols., 2009). Estos resultados evidencian el papel fundamental que el Glut ejerce no sólo durante los procesos de aprendizaje, sino también en los procesos de memoria, tanto espacial como de reconocimiento (Czakoff y Howland, 2010). En este sentido, el aumento de Glut asociado a la edad que se ha demostrado anteriormente y se ha replicado mediante las técnicas bioquímicas utilizadas en esta tesis, sumado a los resultados de los experimentos conductuales con memantina proporcionan una mayor visión del efecto del envejecimiento sobre el funcionamiento de este neurotransmisor, así como sobre su relación con la corticosterona y otros sistemas de neurotransmisión como la ACh y la 5-HT, y las consecuencias conductuales que tienen sobre la memoria (Fig. 45).

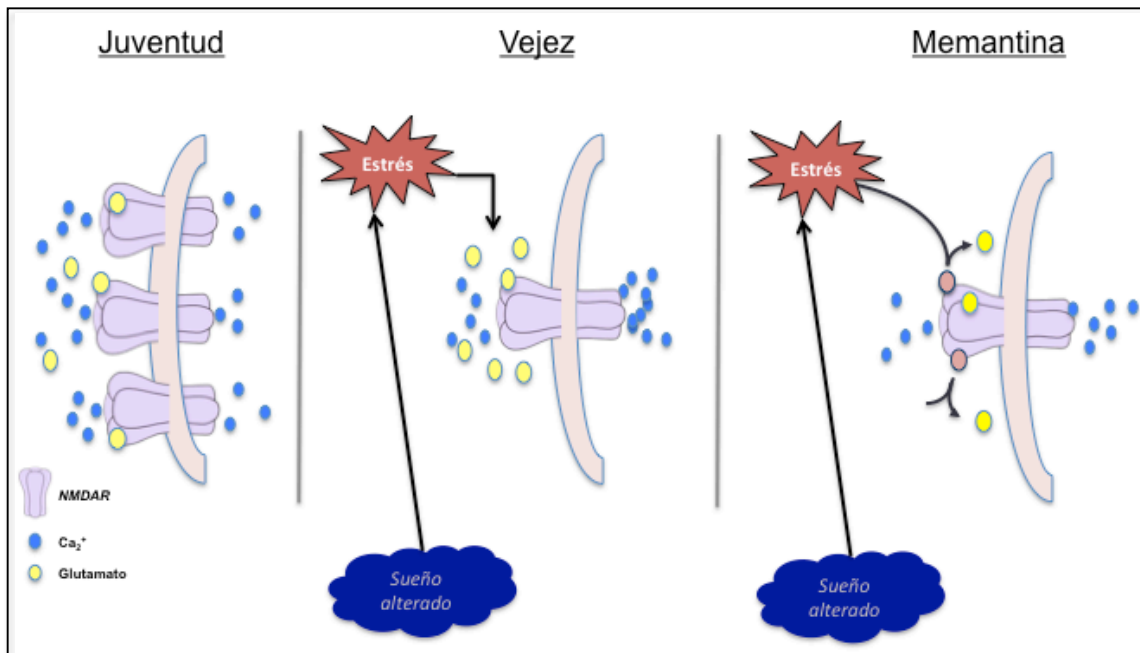


Fig. 45. Esquema de la propuesta para la relación entre el estrés el sueño alterado y el Glut. En la Juventud, existe un equilibrio entre la cantidad de Glut liberado en el espacio sináptico y la cantidad de receptores NMDA. En la «Vejez» el número de estos receptores se ve disminuido y, a su vez, el estrés provocado por las alteraciones del sueño típicas de la vejez y asociadas a patologías neurodegenerativas, como la EA, favorece la liberación de Glut, aumentando su concentración extracelular y los problemas cognitivos que esto conlleva. La administración de memantina, por el contrario, como antagonista de los NMDA, impide que el exceso de Glut inicie la cascada apoptótica por una excesiva entrada de Ca^{2+} .

El mecanismo fisiológico principal que se encarga de organizar la respuesta a los estímulos estresantes implica la integración e interacción de áreas como el hipocampo, la corteza prefrontal y el epítalamo, en un constante proceso de retroalimentación a través de la liberación de neurotransmisores y neuromoduladores específicos (Joëls y Baram, 2009; Ulrich-Lai y Herman, 2009). Se ha demostrado que la corticosterona es capaz de producir cambios en la concentración extracelular de diferentes sustancias relacionadas con la activación y la regulación de procesos cognitivo-conductuales (Robbins, 2005; McEwen, 2007; Ulrich-Lai y Herman, 2009) y fisiológicos (Cohen y cols., 2012). En este sentido, los resultados obtenidos en los análisis por HPLC reflejan varias diferencias significativas que podrían estar relacionadas con estos cambios. La investigación acerca de la modulación serotoninérgica en la liberación de ACh se ha explorado en diferentes áreas cerebrales de las que se tiene constancia que existe inervación de ambos sistemas, como por ejemplo la corteza, el

hipocampo o el estriado (Cassel y Jeltsch, 1995; King y cols., 2008). Se ha explicado en la introducción la importancia del sistema colinérgico en la formación de recuerdos, en la recuperación de la información y en la relevancia que tiene en los procesos de envejecimiento, normal y patológico (García-Alloza y cols., 2005). Muchas de las terapias farmacológicas actuales para el tratamiento de los síntomas cognitivos en la EA y en otros trastornos cognitivos asociados a la edad se basan en la aproximación a los mecanismos de acción e interacción de estos sistemas (Rodríguez y cols., 2012; Russ y Morling, 2012).

La interacción ACh—5-HT y su efecto en la cognición ha sido extensamente documentada en el contexto de los trastornos cognitivos asociados a la edad (García-Alloza y cols., 2005; Xu y cols., 2012). Por ello, la combinación de ambos sistemas se tiene en cuenta para diseñar nuevas estrategias farmacológicas preventivas de esta sintomatología (Xu y cols., 2012). Estudios animales han demostrado que el bloqueo combinado de los sistemas colinérgico y serotoninérgico contribuye al empeoramiento y deterioro de la conducta (lo que podría considerarse la capacidad cognitiva) (Vanderwolf, 1987). Se ha sugerido que la 5-HT participa activamente en el mantenimiento de las capacidades cognitivo-conductuales en aquellos casos en que los niveles de actividad colinérgica se ven especialmente reducidos (García-Alloza y cols., 2005), y los resultados obtenidos mediante el análisis de ELISA y HPLC realizados en esta tesis son coherentes con esta idea. El claro aumento asociado a la edad en los niveles de corticosterona plasmática de las *O. degus* es coherente con los el aumento de Glut en la corteza y el hipocampo (Mussazi y cols., 2010), así como con la reducción en los niveles de 5-HT (Lowy y cols., 1995).

Se ha demostrado que existe un abundante número de receptores 5-HT₄ y 5-HT₆ tanto en esta área como en la corteza prefrontal (King y cols., 2008), desde donde se ha descrito que ejercen indirectamente la regulación de la liberación de ACh y otros neurotransmisores en áreas relacionadas (Fig. 46).

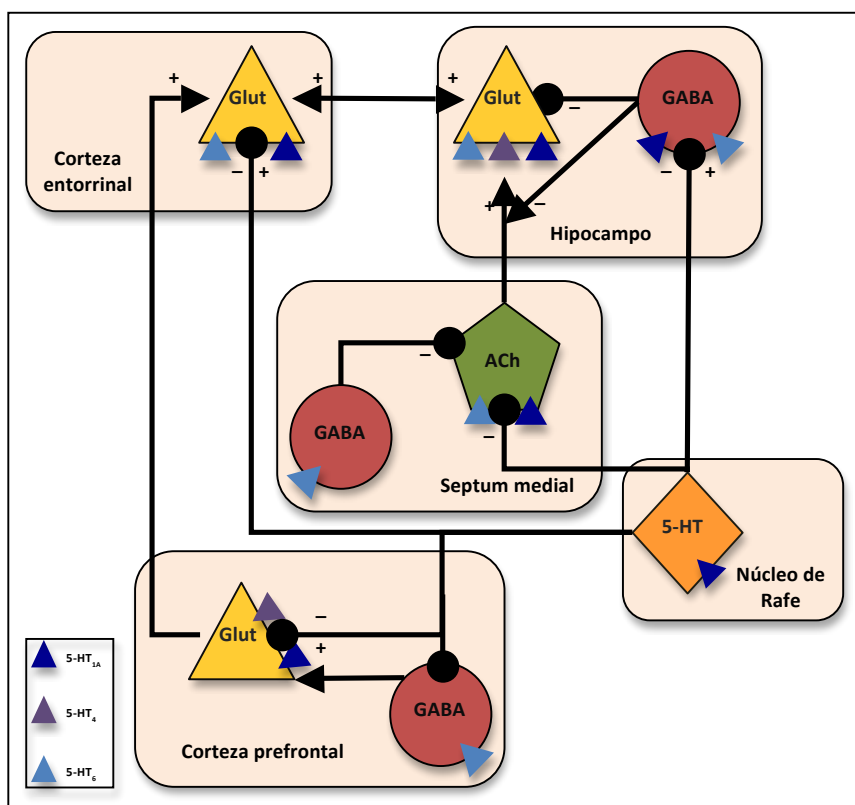


Fig. 46. Receptores de 5-HT implicados en el aprendizaje y la memoria. La figura muestra áreas del cerebro y rutas neuronales posiblemente implicadas en el rol de los receptores 5-HT_{1A}, 5-HT₄ y 5-HT₆ sobre los procesos de memoria y aprendizaje. Las neuronas del núcleo de Rafe proyectan hacia el hipocampo, las cortezas prefrontal y entorrinal. Cuando se conoce la localización particular de un receptor 5-HT, se indica colocándolo sobre la neurona correspondiente. Esto no implica necesariamente que ambos receptores coexistan en la misma neurona. Las → indican conexión entre regiones, mientras que —● indica rutas establecidas. La acción de la ruta sobre las neuronas se muestra con +, para estimulación, y -, para inhibición. Por las características de cada receptor, las rutas que terminan en la activación postsináptica de 5-HT_{1A} se señalan como -, mientras que las que terminan en la activación de 5-HT₄ y 5-HT₆ son estimulantes (adaptado de King y cols., 2008).

Estos datos son coherentes con los resultados obtenidos en esta tesis. La reducción de 5-HT asociada a la edad en corteza frontal e hipocampo estaría directamente relacionada con el aumento de Glut en ambas estructuras, así como con la reducción de ACh en la corteza. sugiere que este neurotransmisor Estos datos son de especial interés en el marco de la EA, en tanto que relacionan directamente las alteraciones en los sistemas de neurotransmisión con los déficits en memoria y aprendizaje típicos de la enfermedad. Este efecto se vería agravado con la edad, dado que como muestran los resultados, las *O. degus* más jóvenes son las que

poseen un nivel mayor de 5-HT y ACh en corteza e hipocampo, y una mayor cantidad de Glut en ambas estructuras, lo que concuerda con los datos sobre la interacción de estos sistemas.

¿Cómo relacionar los resultados con el sueño y la memoria?

Entre sus muchas funciones, los ritmos circadianos también regulan la fluctuación de neurotransmisores en el SNC. El sueño influye en la disponibilidad y síntesis de estas sustancias, y existen varios trabajos tanto en humanos como en modelos animales que sugieren una relación entre el buen funcionamiento de los ciclos de sueño-vigilia y un estado cognitivo intacto (Binder y cols., 2012; Johnson y cols., 2012). Asimismo, elementos como el Glut, la ACh y la 5-HT son determinantes para la aparición y mantenimiento de la conducta del sueño. Como se ha comentado anteriormente, el papel de los diferentes sistemas de neurotransmisión en el mantenimiento de un buen estado mental y el deterioro cognitivo está extensamente documentado. Por otra parte, es amplia la evidencia que vincula las alteraciones de los ritmos circadianos con el deterioro cognitivo (Novati y cols., 2011; Kondratova y Kondratov, 2012; Schmidt y cols., 2012) y en particular con el deterioro cognitivo asociado a la edad y en la EA (Roh y cols., 2012). Sobre lo que no existe un gran consenso es acerca de los mecanismos por los cuales estas alteraciones del sueño causan aquellos problemas, y sobre cuál de estos fenómenos ocurre antes. Una posibilidad, sería que los cambios asociados a la edad que se producen en el equilibrio químico del cerebro iniciaran las alteraciones del sueño típicas de la edad y otros trastornos asociados a ésta. El estrés generado por la disrupción del ciclo normal de sueño-vigilia podría estar empeorando a su vez el equilibrio neuroquímico del cerebro que afecta a los sistemas de neurotransmisión y, por consiguiente, a su papel en los diferentes procesos cognitivos. Se sabe que ambos fenómenos, la ritmicidad y la actividad neuroquímica, cambian en el envejecimiento, y que ambos se ven modulados por la respuesta al estrés. Se podría sugerir que a medida que uno envejece, este equilibrio se vuelve más

delicado, creando un bucle en el que las alteraciones de uno de los vértices de este triángulo afecten al funcionamiento de otro (Fig. 47).

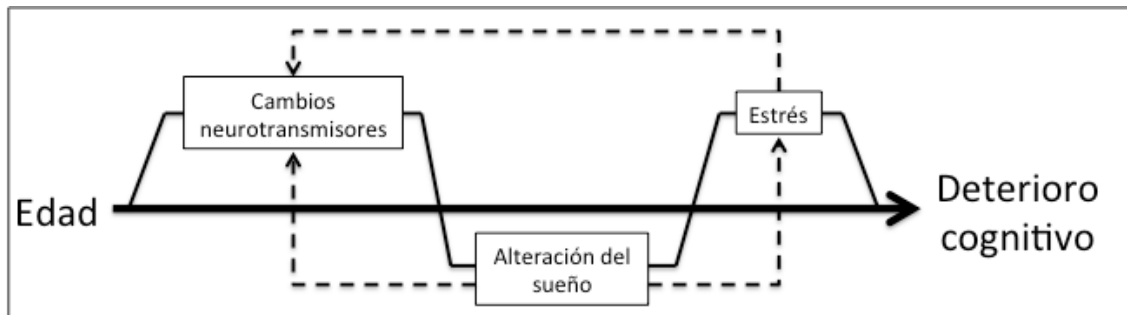


Fig. 47. Esquema de la relación entre los niveles de neurotransmisores, el sueño, la edad y el deterioro cognitivo. Los cambios en los niveles de neurotransmisores que vienen asociados a la edad pueden ser el detonante para la aparición de las alteraciones de sueño típicas de la tercera edad y otros trastornos neurodegenerativos, como la EA. La alteración de la conducta de sueño normal tiene dos efectos: por un lado, es una fuente de estrés; por otro, genera aún más inestabilidad en los diferentes sistemas implicados en la memoria, como el Glut o la ACh. A su vez, el estrés generado por un sueño alterado agravaría el desequilibrio neuroquímico de estos elementos. Todo esto lleva a un agravamiento del declive cognitivo y los consiguientes problemas asociados.

Los resultados obtenidos en esta tesis pueden ayudar a la interpretación. Merece la pena señalar que el acúmulo de neuronas colinérgicas situado en el puente con proyecciones a zonas del cerebro íntimamente relacionadas con funciones fisiológicas básicas, entre ellas el sueño. Los resultados conductuales de este estudio muestran que los animales no presentan déficit de conducta en condiciones de sueño normal, ni tampoco cuando son tratados con memantina y privados de sueño, pero que su desempeño en las tareas de memoria sí se ve afectada tras la privación total de sueño sin este fármaco. Los análisis por ELISA de los niveles de corticosterona revelan que ésta es un factor distintivo en la aparición de este deterioro. Los niveles de ACh y Glut varían en senectud avanzada.

En senectud avanzada hay déficit tras privación de sueño, algo que no se observa con una conducta de sueño normal, por lo tanto, el déficit cognitivo pudiera ser debido al aumento en los niveles de corticosterona en la privación de sueño, más que a un problema en la disponibilidad de neurotransmisores. La importancia del equilibrio entre los distintos sistemas de neurotransmisión implicados puede ser la causa de porqué la memantina tiene un efecto

protector sobre el deterioro cognitivo inducido por privación de sueño. No obstante, aunque los distintos experimentos y resultados de este estudio aportan una visión explicativa del conjunto del fenómeno, no cabe duda de que es necesario ampliar las investigaciones para una mejor comprensión de la naturaleza de la interacción entre todos estos procesos.

3. Perspectivas futuras

Este es el primer estudio realizado sobre el efecto de la edad, el estrés y el deterioro cognitivo inducido por privación de sueño en un modelo de *O. degus*. Por este motivo, aunque los resultados contestan muchas preguntas planteadas al respecto, otras muchas merecen ser exploradas.

En primer lugar, sería complementario ampliar la gama de marcadores bioquímicos que pudieran estar interviniendo en los procesos descritos en este estudio. En este sentido, dos de los compuestos que podrían tener una participación mayor en las distintas funciones son la noradrenalina y el óxido nítrico. La primera, debido a la gran influencia que tiene con otros sistemas de neurotransmisión y a su destacada presencia en los procesos de estrés. El segundo, por la importancia de los radicales libres y los procesos oxidativos que ocurren en el envejecimiento, los cuales parecen estar implicados directamente en varios de los aspectos de deterioro cognitivo asociado a la edad.

Segundo, dado que uno de los mayores valores del *O. degus* es la acumulación espontánea de placas de proteína β A y de tau hiperfosforilada, un paso necesario para validar los resultados preliminares obtenidos por otros grupos de investigación es la realización de un exhaustivo estudio *post mortem* de las regiones implicadas en esta enfermedad. Correlacionando los posibles resultados con el déficit cognitivo asociado a la edad demostrado en este estudio, la descripción y exploración detallada de los marcadores histopatológicos sería

fundamental para asentar a este roedor como modelo natural de la EA. Además, un estudio *post mortem* añadiría valor a los análisis realizados con HPLC, lo que permitiría ampliar las conclusiones obtenidas en esta tesis.

En paralelo a los avances clínicos en el tratamiento farmacológico para los síntomas cognitivos de la EA, también sería interesante trasladar las nuevas terapias a estos animales, con el fin de ampliar el conocimiento sobre los mecanismos de acción en un modelo más similar a la patología humana que el que aportan otros modelos animales. En este sentido, los buenos resultados con la memantina obtenidos en este estudio son prometedores. Actualmente, junto con inhibidores de la colinesterasa, los antagonistas de los receptores NMDA son tratamiento de elección en la farmacoterapia para la EA. Explorar los beneficios sobre la conducta de la combinación de estas dos categorías de fármacos es un aspecto con un gran y beneficioso potencial clínico.

Por último, cabría plantear una exploración más detallada del sistema glutamatérgico en estos animales, dados los datos disponibles en la literatura y los resultados obtenidos en este estudio, tanto por cromatografía como por el tratamiento con memantina. En los últimos años ha aumentado el número de estudios que investigan la función del Glut en el deterioro cognitivo asociado a la edad centrándose en el papel de las células gliales. Así pues, merecería la pena examinar estas células como posibles dianas para comprobar, dada su participación en los procesos de deterioro cognitivo, si resultan un objetivo con potencial terapéutico.

CONCLUSIONES

1. La privación de sueño es un paradigma válido para inducir deterioro cognitivo transitorio en los estudios de memoria que se sirvan del *O. degus* como modelo experimental.
2. La edad es un factor de sensibilización para el efecto de la privación de sueño, ya que el deterioro producido por este procedimiento es significativamente mayor en los animales de mayor edad.
3. La privación de sueño incrementa los niveles de corticosterona plasmática de forma significativa respecto a los niveles obtenidos tras un periodo de sueño normal. Este incremento aumenta significativamente con la edad.
4. Los niveles de Glut, ACh y 5HT en la corteza frontal y el hipocampo del *O. degus*, se ven alterados con la edad: la ACh y la 5-HT disminuyen en la corteza y el hipocampo, respectivamente, mientras que el Glut aumenta en ambas estructuras.
5. La memantina, antagonista parcial de los receptores NMDA de Glut, administrada previamente a la privación de sueño tiene un efecto protector significativo sobre el deterioro cognitivo que se mantiene en los individuos añosos.
6. La relación entre el Glut, la ACh, la 5-HT y los niveles de corticosterona alterados por la privación de sueño indican deterioro cognitivo
7. La mejoría en la ejecución de las tareas tras la administración de memantina revela un papel crítico de este neurotransmisor en los procesos de memoria de referencia y memoria de trabajo evaluados mediante los paradigmas de RAM, BM y NOR, y confirmaría la prescripción de este fármaco en el deterioro de los procesos mnésicos asociados a la edad.

BIBLIOGRAFÍA

- Aalto S, Brück A, Laine M, Någren K, Rinne JO (2005) Frontal and temporal dopamine release during working memory and attention tasks in healthy humans: a positron emission tomography study using the high-affinity dopamine D2 receptor ligand [11C]FLB 457. *J Neurosci*, 25: 2471–2477
- Albert MS (2011) Changes in cognition. *Neurobiol Aging*, 32: S58–S63
- Aleisa AM, Helal G, Alhaider IA, Alzoubi KH, Srivareerat M, Tran TT, Al-Rejaie SS, Alkadhi KA (2011a) Nicotine treatment prevents REM sleep deprivation-induced learning and memory impairment in rat. *Hippocampus*, 21: 899–909
- Aleisa AM, Alzoubi KH, Alkadhi K (2011b) Post-learning REM sleep deprivation impairs long-term memory: reversal by acute nicotine treatment. *Neurosci Lett*, 499: 28–31
- Alhaider IA, Aleisa AM, Tran TT, Alkadhi KA (2011) Sleep deprivation prevents stimulation-induced increases of levels of P-CREB and BDNF: protection by caffeine. *Mol Cell Neurosci*, 46: 742–751
- Allard S, Gosein V, Cuello AC, Ribeiro-Da-Silva A (2011) Changes with aging in the dopaminergic and noradrenergic innervation of rat neocortex. *Neurobiol Aging*, 32: 224–2253
- Alzoubi KH, Khabour OF, Rashid BA, Damaj IM, Salah HA (2012). The neuroprotective effect of vitamin E on chronic sleep deprivation-induced memory impairment: the role of oxidative stress. *Behav Brain Res*, 226: 205–210
- Andrews-Hanna JR, Snyder AZ, Vincent JL, Lustig C, Head D, Raichle ME, Buckner RL (2007) Disruption of large-scale brain systems in advanced aging. *Neuron*, 56: 924–935
- Anisman H, Matheson K (2005) Stress, depression, and anhedonia: caveats concerning animal models. *Neurosci Biobehav Rev*, 29: 525–546
- Antonijevic I (2008) HPA axis and sleep: identifying subtypes of major depression. *Stress*, 11: 15–27
- Antunes M, Biala G (2011) The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. *Cogn Process*, 2011. doi:10.1007/s10339-011-0430-z
- Ardiles AO, Tapia-Rojas CC, Mandal M, Alexandre F, Kirkwood A, Inestrosa NC, Palacios AG (2012) Postsynaptic dysfunction is associated with spatial and object recognition memory loss in a natural model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 109: 13835–13840
- Armstrong RA (2006) Plaques and tangles and the pathogenesis of Alzheimer's disease," *Folia Neuropathologica*, 44: 1–11

- Auld DS, Kornecook TJ, Bastianetto S, Quirion R (2002) Alzheimer's disease and the basal forebrain cholinergic system: relations to beta-amyloid peptides, cognition, and treatment strategies. *Prog Neurobiol*, 68: 209–245
- Babiloni C, Vecchio F, Lizio R, Ferri R, Rodriguez G, Marzano N, Frisoni GB, Rossini PM (2011) Resting state cortical rhythms in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: electroencephalographic evidence. *J Alzheimers Dis*, 26: 201–214
- Ballard C, Corbett A, Jones EL (2011b) Dementia: challenges and promising developments. *Lancet Neurol*, 10: 7–9
- Ballard C, Gauthier S, Corbett A, Brayne C, Aarsland D, Jones E (2011a) Alzheimer's disease. *Lancet*, 377: 1019–1031
- Barnes CA (1979) Memory deficits associated with senescence: a neurophysiological and behavioral study in the rat. *J Comp Physiol Psychol*, 93: 74–104
- Bartrés-Faz D, Clemente I, Junqué C (1999) Alteración cognitiva en el envejecimiento normal: nosología y estado actual. *Rev Neurol*, 29: 64–70
- Baum LW (2005) Sex, hormones, and Alzheimer's disease. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 60: 736–43
- Begega A, Cuesta M, Rubio S, Méndez M, Santín LJ, Arias JL (2012) Functional networks involved in spatial learning strategies in middle-aged rats. *Neurobiol Learn Mem*, 97: 346–53
- Bekris LM, Yu CE, Bird TD, Tsuang DW (2010) Genetics of Alzheimer's disease. *J Geriatr Psychiatry Neurol*, 23: 213–227
- Benedetti F, Colombo C (2011) Sleep deprivation in mood disorders. *Neuropsychobiology*, 64: 141–151
- Benedetti F, Dallaspezia S, Fulgosi M, Lorenzi C, Serretti A, Barbini B, Colombo C, Smeraldi E (2007) Actimetric evidence that CLOCK 3111 T/C SNP influences sleep and activity patterns in patients affected by bipolar depression. *Am J Med Genet*, 144B: 631–635
- Berger-Sweeney J. The cholinergic basal forebrain system during development and its influence on cognitive processes: important questions and potential answers. *Neurosci Behav Rev* 2003;27:401–11.
- Bigl M, Apelt J, Eschrich K, Schliebs R (2003) Cortical glucose metabolism is altered in aged transgenic Tg2576 mice that demonstrate Alzheimer plaque pathology. *J Neural Transm*, 110: 77–94
- Binder S, Baier PC, Mölle M, Inostroza M, Born J, Marshall L (2012) Sleep enhances memory consolidation in the hippocampus-dependent object-place recognition task in rats. *Neurobiol Learn Mem*, 97: 213–219.

- Birks J, Grimley Evans J, Iakovidou V, Tsolaki M, Holt FE (2006) Rivastigmine for Alzheimer's disease. *Cochrane Database Syst. Rev.* 15(2), CD001191.
- Birks J, Harvey RJ (2009) Donepezil for dementia due to Alzheimer's disease. *Cochrane Database Syst. Rev.* 25(1), CD001190
- Birtheimer A, Stemmelin J, Jackisch R, Cassel JC (2003). Presynaptic modulation of acetylcholine, noradrenaline, and serotonin release in the hippocampus of aged rats with various levels of memory impairments. *Brain Research Bulletin*, 60: 283–296
- Bishop N, Lu T, Yankner B (2010) Neural mechanisms of ageing and cognitive decline. *Nature*, 464: 529–535
- Blalock EM, Geddes JW, Chen KC, Porter NM, Markesbery WR, Landfield PW (2004) Incipient Alzheimer's disease: microarray correlation analyses reveal major transcriptional and tumor suppressor responses. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 101: 2173–2178
- Bliwise DL (2004) Sleep disorders in Alzheimer's disease and other dementias. *Clin Cornerstone*, 6: S16–28
- Bodnoff SR, Humphreys AG, Lehman JC, Diamond DM, Rose GM, Meaney MJ (1995) Enduring effects of chronic corticosterone treatment on spatial learning, synaptic plasticity, and hippocampal neuropathology in young and mid-aged rats. *J Neurosci*, 15: 61–69
- Bombois S, Derambure P, Pasquier F, Monaca C (2010) Sleep disorders in aging and dementia. *J Nutr Health Aging*, 14: 212–217
- Born J, Wilhelm I (2012) System consolidation of memory during sleep. *Psychol Res*, 76: 192–203
- Bowen DM, Procter AW, Mann DM, Snowden JS, Esiri MM, Neary D, Francis PT (2008) Imbalance of a serotonergic system in frontotemporal dementia: implication for pharmacotherapy. *Psychopharmacology*, 196: 603–610
- Braidy N, Muñoz P, Palacios AG, Castellano–Gonzalez G, Inestrosa NC, Chung RS, Sachdev P, Guillemin GJ (2012) Recent rodent models for Alzheimer's disease: clinical implications and basic research. *J Neural Transm*, 119: 173–195
- Bremner JD, Elzinga B, Schmahl C, Vermetten E (2008) Structural and functional plasticity of the human brain in posttraumatic stress disorder. *Prog Brain Res*, 167: 171–186
- Bresink I, Benke TA, Collett VJ, Seal AJ, Parsons CG, Henley JM, Collingridge GL (1996) Effects of memantine on recombinant rat NMDA receptors expressed in HEK 293 cells. *Br J Pharmacol*, 119: 195e204
- Brickell KL, Steinbart EJ, Rumbaugh M, Payami H, Schellenberg GD, Van Deerlin V, Yuan W, Bird TD (2006) Early-onset Alzheimer disease in families with late-onset Alzheimer disease: a potential important subtype of familial Alzheimer disease. *Arch Neurol*, 63: 1307–1311

- Broadbent NJ, Gaskin S, Squire LR, Clark RE (2010) Object recognition memory and the rodent hippocampus. *Learn Mem*, 17: 5–11
- Burke SN, Wallace JL, Nematollahi S, Uprety AR, Barnes CA (2010) Pattern separation deficits may contribute to age-associated recognition impairments. *Behav Neurosci*, 124: 559–573
- Burns A, Zaudig M (2002) Mild cognitive impairment in older people. *Lancet*, 360: 1963–1965
- Busciglio J, Lorenzo A, Yeh J, Yankner BA (1995) β -Amyloid fibrils induce tau phosphorylation and loss of microtubule binding. *Neuron*, 14: 879–888
- Cabeza R (2002) Hemispheric asymmetry reduction in older adults: the HAROLD model. *Psychol Aging*, 17: 85–100
- Cabeza R, Anderson ND, Locantore JK, McIntosh AR (2002) Aging gracefully: compensatory brain activity in high-performing older adults. *Neuroimage*, 17: 1394–1402
- Calhoun ME, Wiederhold KH, Abramowski D, Phinney AL, Probst A, Sturchler-Pierrat C, Staufenbiel M, Sommer B, Jucker M (1998) Neuron loss in APP transgenic mice. *Nature*, 395: 755–756
- Cano G, Mochizuki T, Saper CB (2008) Neural circuitry of stress-induced insomnia in rats. *J Neurosci*, 28: 10167–10184
- Carli M, Samanin R (1992) 8-Hydroxy-2-(di-normal-propylamino)tetralin impairs spatial-learning in a water maze: role of postsynaptic 5-HT_{1A} receptors. *Br J Pharmacol*, 105: 720–726
- Carney RM, Shelton RC (2011) Agomelatine for the treatment of major depressive disorder. *Expert Opin Pharmacother*, 12: 2411–2419
- Carr GV, Schechter LE, Lucki I (2010) Antidepressant and anxiolytic effects of selective 5-HT(6) receptor agonists in rats. *Psychopharmacology* 213: 499–507
- Cassel JC, Jeltsch H (1995) Serotonergic modulation of cholinergic function in the central nervous system: cognitive implications. *Neuroscience*, 69: 1–41
- Cazakoff BN, Howland JG (2010) Acute stress disrupts paired pulse facilitation and long-term potentiation in rat dorsal hippocampus through activation of glucocorticoid receptors. *Hippocampus*, 10: 1327–1331
- Cazakoff BN, Johnson KJ, Howland JG (2010) Converging effects of acute stress on spatial and recognition memory in rodents: A review of recent behavioural and pharmacological findings. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 34: 733–741
- Chang KT, Berg DK (2001) Voltage-gated channels block nicotinic regulation of CREB phosphorylation and gene expression in neurons. *Neuron*, 32: 855–865

- Chen Y, Dubé CM, Rice CJ, Baram TZ (2008) Rapid loss of dendritic spines after stress involves derangement of spine dynamics by corticotropin–releasing hormone. *J Neurosci*, 28: 2903–2911
- Chen Y, Rex CS, Rice CJ, Dubé CM, Gall CM, Lynch G, Baram TZ (2010) Correlated memory defects and hippocampal dendritic spine loss after acute stress involve corticotropin–releasing hormone signaling. *Proc Natl Acad Sci USA*, 107: 13123–13128
- Chowdhury R, Guitart–Masip M, Bunzeck N, Dolan RJ, Düzel E (2012) Dopamine Modulates Episodic Memory Persistence in Old Age. *J Neurosci*, 32: 14193–14142
- Coan EJ, Irving AJ, Collingridge GL (1989) Low–frequency activation of the NMDA receptor system can prevent the induction of LTP. *Neurosci Lett*, 105: 205–210
- Cohen S, Kozlovsky N, Matar MA, Kaplan Z, Zohar J, Cohen H (2012) Post–Exposure Sleep Deprivation Facilitates Correctly Timed Interactions Between Glucocorticoid and Adrenergic Systems, which Attenuate Traumatic Stress Responses. *Neuropsychopharmacology*, 37: 2388–2404
- Collingridge GL, Olsen RW, Peters J, Spedding M (2009) A nomenclature for ligand–gated ion channels. *Neuropharmacology*, 56: 2–5
- Collingridge GL, Volianskis A, Bannister N, France G, Hanna L, Mercier M, Tidball P, Fang G, Irvine MW, Costa BM, Monaghan DT, Bortolotto ZA, Molnár E, Lodge D, Jane DE (2013) The NMDA receptor as a target for cognitive enhancement. *Neuropharmacology*, 64: 13–26
- Colonnello V, Iacobucci P, Fuchs T, Newberry RC, Panksepp J (2010) Octodon degus. A useful animal model for social–affective neuroscience research: basic description of separation distress, social attachments and play. *Neurosci Biobehav Rev*, 35: 1854–1863
- Conboy L, Tanrikut C, Zoladz PR, Campbell AM, Park CR, Gabriel C, Mocaer E, Sandi C, Diamond DM (2009) The antidepressant agomelatine blocks the adverse effects of stress on memory and enables spatial learning to rapidly increase neural cell adhesion molecule (NCAM) expression in the hippocampus of rats. *Int J Neuropsychopharmacol*, 12: 329–341
- Cooke SF, Bliss TV (2006) Plasticity in the human central nervous system. *Brain*, 129: 1659–1673
- Corbett BA, Mendoza S, Wegelin JA, Carmean V, Levine S (2008) Variable cortisol circadian rhythms in children with autism and anticipatory stress. *J Psychiatry Neurosci*, 33: 227–234
- Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses AD, Haines JL, Pericak–Vance MA (1993) Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer’s disease in late onset families. *Science*, 261: 921–923
- Córdoba–Montoya DA, Albert J, López–Martín S (2010) All together now: long term potentiation in the human cortex. *Rev Neurol*, 51: 367–374

- Costantini C, Weindruch R, Della Valle G, Puglielli L (2005) A TrkA-to-p75NTR molecular switch activates amyloid β -peptide generation during aging. *Biochem J*, 391: 59–67
- Crowe SF, Sherry JM, Hale MW (2008) Remembering that things have changed: A review of the cellular mechanisms of memory re-consolidation in the day-old chick. *Brain Res Bull*, 76: 192–197
- Crowley K (2011) Sleep and sleep disorders in older adults. *Neuropsychol Rev*, 21: 41–53
- Crystal JD (2010) Episodic-like memory in animals. *Behav Brain Res*, 215: 235–243
- Cummings BJ, Pike CJ, Shankle R, Cotman CW (1996) β -Amyloid deposition and other measures of neuropathology predict cognitive status in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 17: 921–933
- Damasio A. En busca de Spinoza: neurobiología de la emoción y los sentimientos. Ed. Critica. Barcelona, 2005
- Danysz W, Parsons CG (2003) The NMDA receptor antagonist memantine as a symptomatological and neuroprotective treatment for Alzheimer's disease: preclinical evidence. *Int J Geriatr Psychiatry*, 18: S23eS32
- Davis EL, Levine LJ (2013) Emotion Regulation Strategies That Promote Learning: Reappraisal Enhances Children's Memory for Educational Information. *Child Dev*, 84: 361–374
- Davis KL, Mohs RC, Marin D, Purohit DP, Perl DP, Lantz M, et al. (1999) Cholinergic markers in elderly patients with early signs of Alzheimer disease. *JAMA*, 281: 1401–1406
- Davis M (2011) NMDA receptors and fear extinction: implications for cognitive behavioral therapy. *Dialogues Clin Neurosci*, 13: 463–474
- de Barreda EG, Dawson HN, Vitek MP, Avila J (2010) Tau deficiency leads to the upregulation of BAF-57, a protein involved in neuron-specific gene repression. *FEBS Lett*, 584: 2265–2270
- Deiana S, Platt B, Riedel G (2011) The cholinergic system and spatial learning. *Behav Brain Res*, 221: 389–411
- Del Bel EA, Slater P (1991) Binding to the glycine site of the NMDA receptor complex in brains of patients with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*, 131: 75–78
- DeMattos RB, Cirrito JR, Parsadanian M, May PC, O'Dell MA, Taylor JW, Harmony JA, Aronow BJ, Bales KR, Paul SM, Holtzman DM (2004) ApoE and clusterin cooperatively suppress A β levels and deposition: evidence that ApoE regulates extracellular A β metabolism *in vivo*. *Neuron*, 41: 193–202
- Depboylu C, Lohmüller F, Du Y, Riemenschneider M, Kurz A, Gasser T, Müller U, Dodel RC (2006) Alpha2-macroglobulin, lipoprotein receptor-related protein and lipoprotein receptor-

- associated protein and the genetic risk for developing Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*, 400: 187–190
- Descamps A, Cespeglio R (2010) Influence of aging on the sleep rebound induced by immobilization stress in the rat. *Brain Res*, 1335: 14–23
- Diamond DM, Campbell AM, Park CR, Woodson JC, Conrad CD, Bachstetter AD, Mervis RF (2006) Influence of predator stress on the consolidation versus retrieval of long-term spatial memory and hippocampal pinogenesis. *Hippocampus*, 16: 571–576
- Diekelmann S, Wilhelm I, Born J (2009) The whats and whens of sleep-dependent memory consolidation. *Sleep Med Rev*, 13: 309–321
- Dodds CM, Bullmore ET, Henson RN, Christensen S, Miller S, Smith M, Dewit O, Lawrence P, Nathan PJ (2011) Effects of donepezil on cognitive performance after sleep deprivation. *Hum Psychopharmacol*, 26: 578–587
- Dominguez E, Chin TY, Chen CP, Wu TY (2011) Management of moderate to severe Alzheimer's disease: Focus on memantine. *Taiwan J Obstet Gynecol*, 50: 415–423
- Doraiswamy PM (2003) The role of the N-methyl-D-aspartate receptor in Alzheimer's disease: therapeutic potential. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 3: 373–378
- Dorey R, Piérard C, Chauveau F, David V, Béracochéa D (2012) Stress-Induced Memory Retrieval Impairments: Different Time-Course Involvement of Corticosterone and Glucocorticoid Receptors in Dorsal and Ventral Hippocampus. *Neuropsychopharmacology*, 37: 2870–2878
- Durmer JS, Dinges DF (2005) Neurocognitive consequences of sleep deprivation. *Semin Neurol*, 25: 117–129
- Duyckaerts C (2004) Looking for the link between plaques and tangles. *Neurobiol Aging*, 25: 735–739
- Eisenberg D, Jucker M (2012) The amyloid state of proteins in human diseases. *Cell*, 148: 1188–1203
- El-Ghundi M, O'Dowd BF, George SR (2007) Insights into the role of dopamine receptor systems in learning and memory. *Rev Neurosci*, 18: 37–66
- Eldridge J, Brodish A, Kute T, Landfield P (1989) Apparent age-related resistance of type II hippocampal corticosteroid receptors to down-regulation during chronic escape training. *J Neurosci*, 9: 3237–3242
- Ennaceur A (2010) One-trial object recognition in rats and mice: methodological and theoretical issues. *Behav Brain Res*, 215: 244–254

- Fakhri M (2012) Age-related frontal hyperactivation observed across different working memory tasks: An fMRI study. *Behav Neurosci*, 25: 351–631
- Fang M, Li J, Tiu SC, Zhang L, Wang M, Yew DT (2005) N-methyl-D-aspartate receptor and apoptosis in Alzheimer's disease and multiinfarct dementia. *J Neurosci Res*, 81: 269–274
- Feng Z, Chang Y, Cheng Y, Zhang BL, Qu ZW, Qin C and Zhang JT (2004a) Melatonin alleviates behavioral deficits associated with apoptosis and cholinergic system dysfunction in the APP 695 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Pineal Res*, 37: 129–136
- Feng Z, Cheng Y, Zhang JT (2004b) Long-term effects of melatonin or 17 β -estradiol on improving spatial memory performance in cognitively impaired, ovariectomized adult rats. *J Pineal Res*, 37: 198–206.
- Ferbinteanu J, Kennedy PJ, Shapiro ML (2006) Episodic memory—from brain to mind. *Hippocampus*, 16: 691–703
- Ferrer I (2012) Defining Alzheimer as a common age-related neurodegenerative process not inevitably leading to dementia. *Prog Neurobiol*, 97: 38–51
- Fitzjohn SM, Doherty AJ, Collingridge GL (2008) The use of the hippocampal slice preparation in the study of Alzheimer's disease. *Eur J Pharmacol*, 585: 50–59
- Foreman N, Ermakova E. The radial arm maze: twenty years of the radial arm maze. En: Foreman N, Gillett R, editors *A handbook of spatial research paradigms and methodologies*, Vol 2 Clinical and Comparative issues Hove, UK: Psychology Press, 1998, pp. 87–143
- Fortin DA, Davare MA, Srivastava T, Brady JD, Nygaard S, Derkach VA, Soderling TR (2010) Long-term potentiation-dependent spine enlargement requires synaptic Ca²⁺-permeable AMPA receptors recruited by CaM-kinase I. *J Neurosci*, 30: 11565–11575
- Francis PT (2005) The Interplay of Neurotransmitters in Alzheimer's Disease. *CNS Spectr*, 10: 6–9
- Fraser HB, Khaitovich P, Plotkin JB, Paabo S, Eisen MB (2005) Aging and gene expression in the primate brain. *PLoS Biol*, 3: e274
- Frassetto A, Zhang J, Lao JZ, White A, Metzger JM, Fong TM, Chen RZ (2008) Reduced sensitivity to diet-induced obesity in mice carrying a mutant 5-HT₆ receptor. *Brain Res*, 1236: 140–144
- Fuster-Matanzo A, Llorens-Martín M, de Barreda EG, Ávila J, Hernández F (2011) Different susceptibility to neurodegeneration of dorsal and ventral hippocampal dentate gyrus: a study with transgenic mice overexpressing GSK3 β . *PLoS One*, 6: e27262
- Galvão MdeO, Sinigaglia-Coimbra R, Kawakami SE, Tufik S, Suchecki D (2008) Paradoxical sleep deprivation activates hypothalamic nuclei that regulate food intake and stress response. *Psychoneuroendocrinology*, 34: 1176–1183

- García-Alloza M, Gil-Bea FJ, Diez-Ariza M, Chen CP, Francis PT, Lasheras B, Ramirez MJ (2005) Cholinergic-serotonergic imbalance contributes to cognitive and behavioral symptoms in Alzheimer's disease. *Neuropsychologia*, 43: 442–449
- García-Alloza M, Hirst W, Chen CP, Lasheras B, Francis PT, Ramírez M (2004) Differential involvement of 5-HT(1B/1D) and 5-HT6 receptors in cognitive and non-cognitive symptoms in Alzheimer's disease. *Neuropsychopharmacology*, 29: 410–416
- Garrido P (2011) Aging and stress: past hypotheses, present approaches and perspectives. *Ageing Dis*, 2: 80–99
- Geddes JW, Chang-Chui H, Cooper SM, Lott IT, Cotman CW (1986) Density and distribution of NMDA receptors in the human hippocampus in Alzheimer's disease. *Brain Res*, 399: 156–161
- Gentleman SM, Nash MJ, Sweeting CJ, Graham DI, Roberts GW (1993) β -Amyloid precursor protein (β APP) as a marker for axonal injury after head injury. *Neuroscience Letters*, 160: 139–144
- German DC, Eisch AJ (2004) Mouse models of Alzheimer's disease: insight into treatment. *Rev Neurosci*, 15: 353–369
- Gonnissen HK, Hursel R, Rutters F, Martens EA, Westerterp-Plantenga MS (2012) Effects of sleep fragmentation on appetite and related hormone concentrations over 24 h in healthy men. *Br J Nutr*, 8: 1–9
- Gonzalez MM, Valatx JL (1997) Effects of intracerebroventricular administration of alpha-helical CRH (9–41) on the sleep/waking cycle in rats under normal conditions or after subjection to an acute stressful stimulus. *J Sleep Res*, 6: 164–170
- Goto Y, Grace AA (2008) Dopamine modulation of hippocampal prefrontal cortical interaction drives memory guided behavior. *Cereb Cortex*, 18: 1407–1414
- Gotz J, Streffer JR, David D, Schild A, Hoerndli F, Pennanen L, Kurosinski P, Chen F (2004) Transgenic animal models of Alzheimer's disease and related disorders: histopathology, behavior and therapy. *Mol Psychiatry*, 9: 664–683
- Goulart BK, de Lima MNM, de Farias CB, Reolon GK, Almeida VR, Quevedo J, Kapczinski F, Schroder N, Roesler R (2010) Ketamine impairs recognition memory consolidation and prevents learning-induced increase in hippocampal brain-derived neurotrophic factor levels. *Neuroscience*, 167: 969–973
- Grafenhofer D, Jaag C, Keuschnigg C, Keuschnigg M (2006) Probabilistic aging. CESifo Working Paper n° 1680 (<http://www.cesifo-group.de/portal/pls/portal/docs/1/1188236.PDF>)
- Graves LA, Heller EA, Pack AI, Abel T (2003) Sleep deprivation selectively impairs memory consolidation for contextual fear conditioning. *Learn Mem*, 10: 168–176

- Gresack JE, Frick KM (2003) Male mice exhibit better spatial working and reference memory than females in a water–escape radial arm maze task. *Brain Res*, 982: 98–107
- Grønli J, Dagestad G, Milde AM, Murison R, Bramham CR (2012) Post–transcriptional effects and interactions between chronic mild stress and acute sleep deprivation: Regulation of translation factor and cytoplasmic polyadenylation element–binding protein phosphorylation. *Behav Brain Res*, 235: 251–262
- Grothe M, Heinsen H, Teipel SJ (2012) Atrophy of the cholinergic Basal forebrain over the adult age range and in early stages of Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry*, 71: 805–813
- Gruat–Masso A, Nadal–Alemany R, Coll–Andreu M, Portell–Cortes I, Martí–Nicolovius M (1995) Effects of pretraining paradoxical sleep deprivation upon two–way active avoidance. *Behav Brain Res*, 72:181–183
- Gsell W, Jungkunz G, Riederer P (2004) Functional neurochemistry of Alzheimer's disease. *Curr Pharmacol Design*, 10: 265–293
- Gubbins EJ, Gopalakrishnan M, Li J (2010) Alpha7 nAChR–mediated activation of MAP kinase pathways in PC12 cells. *Brain Res*, 1328: 1–11
- Guetg N, Abdel Aziz S, Holbro N, Turecek R, Rose T, Seddik R, Gassmann M, Moes S, Jenoe P, Oertner TG, Casanova E, Bettler B (2010) NMDA receptor–dependent GABAB receptor internalization via CaMKII phosphorylation of serine 867 in GABAB1. *Proc Natl Acad Sci*, 107: 13924–13929
- Haak N, Peters M (2004) Pilgrimages in Partnering with Palliative Care. *Alzheim Care Q*, 5: 300–312
- Haass C, Schlossmacher MG, Hung AY, Vigo–Pelfrey C, Mellon A, Ostaszewski BL, Lieberburg I, Koo EH, Schenk D, Teplow DB, Selkoe DJ (1992) Amyloid beta–peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature*, 359: 322–355
- Haense C, Kalbe E, Herholz K, Hohmann C, Neumaier B, Kraus R, Heiss WD (2012) Cholinergic system function and cognition in mild cognitive impairment. *Neurobiol Aging*, 33: 867–877
- Hagewoud R, Havekes R, Novati A, Keijser JN, Van der Zee EA, Meerlo P (2010) Sleep deprivation impairs spatial working memory and reduces hippocampal AMPA receptor phosphorylation. *J Sleep Res*, 19: 280–288
- Harand C, Bertran F, La Joie R, Landeau B, Mézange F, Desgranges B, Peigneux P, Eustache F, Rauchs G (2012) The Hippocampus Remains Activated over the Long Term for the Retrieval of Truly Episodic Memories. *PLoS One*, 7: e43495
- Hardeland R (2012) Melatonin in aging and disease –multiple consequences of reduced secretion, options and limits of treatment. *Aging Dis*, 3: 194–225

- Hardy J, Gwinn–Hardy K (1998) Genetic classification of primary neurodegenerative disease. *Science*, 282: 1075–1079
- Hashimoto T, Serrano–Pozo A, Hori Y, Adams KW, Takeda S, et al. (2012) Apolipoprotein E, especially apolipoprotein E4, increases the oligomerization of amyloid β peptide. *J Neurosci*, 32: 15181–15192
- Havekes R, Vecsey CG, Abel T (2012) The impact of sleep deprivation on neuronal and glial signaling pathways important for memory and synaptic plasticity. *Cell Signal*, 24: 1251–1260
- Hebb DO (1949) *Organization of Behavior: a Neuropsychological Theory*. New York: John Wiley.
- Hock BJ, Lamb B (2001) Transgenic mouse models of Alzheimer’s disease. *Trends Genet*, 17: S7–12
- Hollingworth P, Harold D, Sims R et al. (2011) Common variants at ABCA7, MS4A6A/MS4A4E, EPHA1, CD33 and CD2AP are associated with Alzheimer’s disease. *Nature Genetics*, 43: 429–436
- Holtzman DM, Bales KR, Tenkova T et al. (2000) Apolipoprotein E isoform–dependent amyloid deposition and neuritic degeneration in a mouse model of Alzheimer’s disease. *Proc Nat Acad Sci USA*, 97: 2892–2897
- Howland JG, Wang YT (2008) Synaptic plasticity in learning and memory: Stress effects in the hippocampus. *Prog Brain Res*, 169:145–158
- Hurtado DE, Molina–Porcel L, Carroll JC, Macdonald C, Aboagye AK, Trojanowski JQ, Lee VM (2012) Selectively Silencing GSK–3 Isoforms Reduces Plaques and Tangles in Mouse Models of Alzheimer’s Disease. *J Neurosci*, 32: 7392–7402
- Hutton M, C. L. Lendon, P. Rizzu et al. (1998) Association of missense and 5’–splice–site mutations in tau with the inherited dementia FTDP–17. *Nature*, 393: 702–705
- Iber C, Ancoli–Israel S, Chesson A, Quan SF, for the American Academy of Sleep Medicine (2007) *The AASM Manual for the Scoring of Sleep and Associated Events: Rules, Terminology and Technical Specifications*. Westchester: American Academy of Sleep Medicine
- Inestrosa NC, Reyes AE, Chacón MA, Cerpa W, Villalón A, Montiel J, Merabachvili G, Aldunate R, Bozinovic F, Aboitiz F (2005) Human–like rodent amyloid–beta–peptide determines Alzheimer pathology in aged wild–type Octodon degu. *Neurobiol Aging*, 26: 1023–1028
- Ishiguro K, Shiratsuchi A, Sato S, Omori A, Arioka M, Kobayashi S, Uchida T, Imahori K (1993) Glycogen synthase kinase 3 beta is identical to tau protein kinase I generating several epitopes of paired helical filaments. *FEBS Lett*, 325: 167–172
- Issa AM, Rowe W, Gauthier S, Meaney MJ (1990) Hypothalamic– pituitary–adrenal activity in aged, cognitively impaired and cognitively unimpaired rats. *J Neurosci*, 10: 3247–3254

- Jacobs HI, Van Boxtel MP, Jolles J, Verhey FR, Uylings HB (2012) Parietal cortex matters in Alzheimer's disease: an overview of structural, functional and metabolic findings. *Neurosci Biobehav Rev*, 36: 297–309
- Jarrard LE (1983) Selective hippocampal lesions and behavior: effects of kainic acid lesions on performance of place and cue tasks. *Behav Neurosci*, 97: 873–89
- Joëls M, Baram TZ (2009) The neuro-symphony of stress. *Nat Rev Neurosci*, 10: 459–466.
- Johnson DE, Drummond E, Grimwood S, Sawant-Basak A, Miller E, et al. (2012) The 5-hydroxytryptamine₄ receptor agonists prucalopride and PRX-03140 increase acetylcholine and histamine levels in the rat prefrontal cortex and the power of stimulated hippocampal θ oscillations. *J Pharmacol Exp Ther*, 341: 681–691
- Joyce JN, Murray AM, Hurtig HI, Gottlieb GL, Trojanowski JQ (1998) Loss of Dopamine D2 Receptors in Alzheimer's Disease with Parkinsonism But Not Parkinson's or Alzheimer's Disease. *Neuropsychopharmacology*, 19: 472–480
- Jugovac D, Cavallero C (2011) Twenty-Four Hours of Total Sleep Deprivation Selectively Impairs Attentional Networks. *Exp Psychol*, 1: 1–9
- Jyoti A, Plano A, Riedel G, Platt B (2010) EEG, activity, and sleep architecture in a transgenic A β PP^{swe}/PSEN1A246E Alzheimer's disease mouse. *J Alzheimers Dis*, 22: 873–878
- Kalaria RN, Perry G (1993) Amyloid P component and other acute-phase proteins associated with cerebellar A β -deposits in Alzheimer's disease. *Brain Research*, 631: 151–155
- Kas MJ, Edgar DM (1998) Crepuscular rhythms of EEG sleep-wake in a hystricomorph rodent, *Octodon degus*. *J Biol Rhythms*, 13: 9–17
- Kato-Semba R, Semba R, Takeuchi IK, Kato K (1998) Age-related changes in levels of brain-derived neurotrophic factor in selected brain regions of rats, normal mice and senescence-accelerated mice: a comparison to those of nerve growth factor and neurotrophin-3. *Neurosci Res*, 31: 227–234
- Kemp A, Manahan-Vaughan D (2007) Hippocampal long-term depression: master or minion in declarative memory processes? *Trends Neurosci*, 30: 111–118
- Kemppainen N, Ruottinen H, Nagren K, Rinne JO (2000) PET shows that striatal dopamine D1 and D2 receptors are differentially affected in AD. *Neurology*, 55: 205–209
- Kerr D, Campbell L, Applegate M, Brodish A, Landfield P (1992) Chronic stress-induced acceleration of electrophysiologic and morphometric biomarkers of hippocampal aging. *J Neurosci*, 11: 1316–1322
- Kim J, Basak JM, Holtzman DM (2009) The role of apolipoprotein E in Alzheimer's disease. *Neuron*, 63: 287–303

- Kimura N, Imamura O, Ono F, Terao K (2007) Aging attenuates dynactin–dynein interaction: down–regulation of dynein causes accumulation of endogenous tau and amyloid precursor protein in human neuroblastoma cells. *J Neurosci Res*, 85: 2909–1916
- Kimura R, Devi L, Ohno M (2010) Partial reduction of BACE1 improves synaptic plasticity, recent and remote memories in Alzheimer's disease transgenic mice. *J Neurochem*, 113: 248–261
- Kimura T, Yamashita S, Nakao S, Park JM, Murayama M, Mizoroki T, Yoshiike Y, Sahara N, Takashima A (2008) GSK–3 β is required for memory reconsolidation in adult brain. *PLoS ONE*, 3: e3540
- King MV, Marsden CA, Fone KC (2008) A role for the 5–HT(1A), 5–HT4 and 5–HT6 receptors in learning and memory. *Trends Pharmacol Sci*, 29: 482–492
- Klostermann EC, Braskie MN, Landau SM, O'Neil JP, Jagust WJ (2012) Dopamine and frontostriatal networks in cognitive aging. *Neurobiol Aging*, 33: 623.e15–623.e24
- Koban M, Stewart CV (2006) Effects of age on recovery of body weight following REM sleep deprivation of rats. *Physiol Behav*, 87: 1–6
- Kogan EA, Korczyn AD, Virchovsky RG, Klimovizky SSh, Treves TA, Neufeld MY (2001) EEG changes during long–term treatment with donepezil in Alzheimer's disease patients. *J Neural Transm*, 108: 1167–1173
- Kondratova A, Kondratov R (2012) The circadian clock and pathology of the ageing brain. *Nat Rev Neurosci*, 13: 325–335
- Koopmans G, Blokland A, van Nieuwenhuijzen P, Prickaerts J (2003) Assessment of spatial learning abilities of mice in a new circular maze. *Physiol Behav*, 79: 683–693
- Kopp C, Longordo F, Nicholson JR, Lüthi A (2006) Insufficient sleep reversibly alters bidirectional synaptic plasticity and NMDA receptor function. *J Neurosci*, 26: 12456–12465
- Kotagal V, Müller ML, Kaufer DI, Koeppe RA, Bohnen NI (2012) Thalamic cholinergic innervation is spared in Alzheimer disease compared to parkinsonian disorders. *Neurosci Lett* 514: 169–172
- Kripke DF, Youngstedt SD, Elliott JA, Tuunainen A, Rex KM, Hauger RL and Marler MR (2005) Circadian phase in adults of contrasting ages. *Chronobiol Int*, 22: 695–709
- Kyriacou CP, Hastings MH (2010) Circadian clocks: genes, sleep, and cognition. *Trends Cogn Sci*, 14: 259–267
- Lai MK, Tsang SW, Alder JT, Keene J, Hope T, Esiri MM, Francis PT, Chen CP (2005) Loss of serotonin 5–HT2A receptors in the postmortem temporal cortex correlates with rate of cognitive decline in Alzheimer's disease. *Psychopharmacology (Berlin)*, 179: 673–677

- Lane RF, Raines SM, Steele JW, Ehrlich ME, Lah JA, Small SA, Tanzi RE, Attie AD, Gandy S (2010) Diabetes-associated SorCS1 regulates Alzheimer's amyloid- β metabolism: evidence for involvement of SorL1 and the retromer complex. *J Neurosci*, 30: 13110–13115
- Laursen P (1997) The impact of aging on cognitive functions. *Acta Neurol Scand*, 172: S3–86
- Lee JH, Barral S, Reitz C (2008) The neuronal sortilin-related receptor gene SORL1 and late-onset Alzheimer's disease. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 8: 384–391
- Lee TM (2004) Octodon degu: a diurnal, social, and long-lived rodent. *ILAR J*, 45: 14–24
- Leuner K, Schütt T, Kurz C, Eckert SH, Schiller C, Occhipinti A, Mai S, Jendrach M, Eckert GP, Kruse SE, Palmiter RD, Brandt U, Dröse S, Wittig I, Willem M, Haass C, Reichert AS, Mueller WE (2012) Mitochondria-derived ROS lead to enhanced amyloid beta formation. *Antiox Redox Signal*, 16: 1421–1433
- Liang WS, Reiman EM, Valla J, Dunckley T, Beach TG, Grover A, Niedzielko TL, Schneider LE, Mastroeni D, Caselli R, Kukull W, Morris JC, Hulette CM, Schmechel D, Rogers J, Stephan DA (2008) Alzheimer's disease is associated with reduced expression of energy metabolism genes in posterior cingulate neurons. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105: 4441–4446
- Liao MC, Hoos MD, Aucoin D, Ahmed M, Davis J, Smith SO, Van Nostrand WE (2010) N-terminal domain of myelin basic protein inhibits amyloid beta-protein fibril assembly. *J Biol Chem*, 285: 35590–35598
- Lilja AM, Porras O, Storelli E, Nordberg A, Marutle A (2011) Functional interactions of fibrillar and oligomeric amyloid-beta with alpha7 nicotinic receptors in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*, 23: 335–347
- Lilley TR, Wotus C, Taylor D, Lee JM, de la Iglesia HO (2011) Circadian regulation of cortisol release in behaviorally split golden hamsters. *Endocrinology*, 153: 732–738
- Lindstrom J (1997) Nicotinic acetylcholine receptors in health and disease. *Mol Neurobiol*. 15: 193–222
- Lisman J, Grace AA, Duzel E (2011) A neoHebbian framework for episodic memory; role of dopamine-dependent late LTP. *Trends Neurosci*, 34: 536–547
- Lissek S (2012) Toward an account of clinical anxiety predicated on basic, neurally mapped mechanisms of Pavlovian fear-learning: the case for conditioned overgeneralization. *Depress Anxiety*, 29: 257–263
- Lizio R, Vecchio F, Frisoni GB, Ferri R, Rodriguez G, Babiloni C (2011) Electroencephalographic rhythms in Alzheimer's disease. *Int J Alzheimers Dis*, 2011: 927573

- Loerch PM, Lu T, Dakin KA, Vann JM, Isaacs A, Geula C, Wang J, Pan Y, Gabuzda DH, Li C, Prolla TA, Yankner BA (2008) Evolution of the aging brain transcriptome and synaptic regulation. *PLoS ONE*, 3: e3329
- Lowy MT, Wittenberg L, Yamamoto BK (1995) Effects of acute stress on hippocampal glutamate levels and spectrin proteolysis in young and aged rats. *J Neurochem* 65: 268–274
- Lu T, Pan Y, Kao SY, Li C, Kohane I, Chan J, Yankner BA (2004) Gene regulation and DNA damage in the ageing human brain. *Nature*, 429: 883–891
- Maeda S, Sahara N, Saito Y, Murayama M, Yoshiike Y, Kim H, Miyasaka T, Murayama S, Ikai A, Takashima A (2007) Granular tau oligomers as intermediates of tau filaments. *Biochemistry*, 46: 3856–3861
- Marchesi VT (2012) Alzheimer's disease 2012: the great amyloid gamble. *Am J Pathol*, 180: 1762–1767
- Martin KP, Wellman CL (2011) NMDA receptor blockade alters stress-induced dendritic remodeling in medial prefrontal cortex. *Cereb Cortex*, 21: 2366–2373
- Masliah E, Alford M, Deteresa R, Mallory M, Hansen L (1996) Deficient glutamate transport is associated with neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Ann Neurol*, 40: 759–766
- Masters CL, Selkoe DJ (2012) Biochemistry of Amyloid β -Protein and Amyloid Deposits in Alzheimer Disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2: a006262
- Matsubara E, Bryant-Thomas T, Pacheco Quinto J, Henry TL, Poeggeler B, et al. (2003) Melatonin increases survival and inhibits oxidative and amyloid pathology in a transgenic model of Alzheimer's disease. *J Neurochem*, 85: 1101–1108
- Mattay VS, Tessitore A, Callicott JH, Bertolino A, Goldberg TE, Chase TN, Hyde TM, Weinberger DR (2002) Dopaminergic modulation of cortical function in patients with Parkinson's disease. *Ann Neurol*, 51: 156–164
- May C, Owens M, Einstein GO (2012) The impact of emotion on prospective memory and monitoring: No pain, big gain. *Psychon Bull Rev*, 19: 1165–1171
- McClung CA (2007) Circadian genes, rhythms and the biology of mood disorders. *Pharmacol Ther*, 114: 222–232
- McDermott CM, Hardy MN, Bazan NG, Magee JC (2006) Sleep deprivation-induced alterations in excitatory synaptic transmission in the CA1 region of the rat hippocampus. *J Physiol*, 570: 553–565
- McEwen BS (2006) Sleep deprivation as a neurobiologic and physiologic stressor: Allostasis and allostatic load. *Metab Clin Exp*, 55: S20–23

- McEwen BS (2007) Physiology and neurobiology of stress and adaptation: Central role of the brain. *Physiol Rev*, 87:873–904
- McEwen BS, Chattarji S (2004) Molecular mechanisms of neuroplasticity and pharmacological implications: the example of tianeptine. *Eur Neuropsychopharm*, 14: S497–S502
- McKenzie JE, Gentleman SM, Roberts GW, Graham DI, Royston MC (1994) Increased numbers of β APP-immunoreactive neurones in the entorhinal cortex after head injury. *NeuroReport*, 6: 161–164
- McShane R, Areosa Sastre A, Minakaran N (2006) Memantine for dementia. Cochrane Database of Systematic Review Issue 2. Art. No.: CD003154
- Medeiros R, Kitazawa M, Caccamo A, Baglietto-Vargas D, Estrada-Hernandez T, Cribbs DH, Fisher A, Laferla FM (2011) Loss of muscarinic M(1) receptor exacerbates Alzheimer's disease-like pathology and cognitive decline. *Am J Pathol*, 179: 980–991
- Meerlo P, Mistlberger RE, Jacobs BL, Heller HC, McGinty D (2009) New neurons in the adult brain: the role of sleep and consequences of sleep loss. *Sleep Med Rev*, 13: 187–194
- Meneses A, Hong E (1999) 5-HT_{1A} receptors modulate the consolidation of learning in normal and cognitively impaired rats. *Neurobiol Learn Mem*, 71: 207–218
- Meng Y, Lee JH, Cheng R, St George-Hyslop P, Mayeux R, Farrer LA (2007) Association between SORL1 and Alzheimer's disease in a genome-wide study. *NeuroReport*, 18: 1761–1764
- Merello M, Sabe L, Teson A, Migliorelli R, Petracchi M, Leiguarda R, Starkstein S (1994) Extrapyrmidalism in Alzheimer's disease: prevalence, psychiatric, and neuropsychological correlates. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 57: 1503–1509
- Millan MJ, Di Cara B, Dekeyne A, Panayi F, De Groote L, Sicard D, Cistarelli L, Billiras R, Gobert A (2007) Selective blockade of dopamine D₃ versus D₂ receptors enhances frontocortical cholinergic transmission and social memory in rats: a parallel neurochemical and behavioral analysis. *J Neurochem*, 100: 1047–1061
- Miller JA, Oldham MC, Geschwind DH (2008) A systems level analysis of transcriptional changes in Alzheimer's disease and normal aging. *J Neurosci*, 28: 1410–1420
- Ming G, Song H (2005) Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annu Rev Neurosci*, 28: 223–250
- Mishima K, Tozawa T, Satoh K, Matsumoto Y, Hishikawa Y, Okawa M (1999) Melatonin secretion rhythm disorders in patients with senile dementia of Alzheimer's type with disturbed sleep-waking. *Biol Psychiatry*, 45: 417–421

- Mishizen–Eberz AJ, Rissman RA, Carter TL, Ikonovic MD, Wolfe BB, Armstrong DM (2004) Biochemical and molecular studies of NMDA receptor subunits NR1/2A/2B in hippocampal subregions throughout progression of Alzheimer's disease pathology. *Neurobiol Dis*, 15: 80–92
- Mitchell ES, Neumaier JF (2005) 5-HT₆ receptors: a novel target for cognitive enhancement. *Pharmacol Ther*, 108: 320–333
- Miwa JM, Stevens TR, King SL, Caldarone BJ, Ibanez–Tallon I, et al. (2006) The prototoxin lynx1 acts on nicotinic acetylcholine receptors to balance neuronal activity and survival in vivo. *Neuron*, 51: 587–600
- Mizoguchi K, Kunishita T, Chui D, Tabira T (1992) Stress induces neuronal death in the hippocampus of castrated rats. *Neurosci Lett*, 138: 157–164
- Mizoguchi K, Tanaka Y, Tabira T (2010) Anxiolytic effect of a herbal medicine, yokukansan, in aged rats: involvement of serotonergic and dopaminergic transmissions in the prefrontal cortex. *J Ethnopharmacol*, 127: 70–76
- Moghekar A, Rao S, Li M, Ruben D, Mammen A, Tang X, O'Brien RJ (2011) Large quantities of Abeta peptide are constitutively released during amyloid precursor protein metabolism in vivo and in vitro. *J Biol Chem*, 286: 15989–15997
- Molnár E (2011) Long–term potentiation in cultured hippocampal neurons. *Semin Cell Dev Biol*, 22: 506–13
- Mu Q, Nahas Z, Johnson KA, Yamanaka K, Mishory A, Koola J, Hill S, Horner MD, Bohning DE, George MS (2005) Decreased cortical response to verbal working memory following sleep deprivation. *Sleep*, 28: 55–67
- Mufson EJ, Counts SE, Fahnstock M, Ginsberg SD (2007) Cholinergic molecular substrates of mild cognitive impairment in the elderly. *Curr Alzheimer Res*, 4: 340–50
- Muhammad A, Flores I, Zhang H, Yu R, Staniszewski A, Planel E, Herman M, Ho L, Kreber R, Honig LS, Ganetzky B, Duff K, Arancio O, Small SA (2008) Retromer deficiency observed in Alzheimer's disease causes hippocampal dysfunction, neurodegeneration, and A–beta accumulation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105: 7327–7332
- Mussazi L, Milanese M, Farisello P, Zappettini S, Tardito D, et al. (2010) Acute stress increases depolarization–evoked glutamate release in the rat prefrontal/frontal cortex: the dampening action of antidepressants. *PLoS One*, 5: e8566
- Nagel IE, Preuschhof C, Li SC, Nyberg L, Backman L, Lindenberger U, Heekeren HR (2009) Performance level modulates adult age differences in brain activation during spatial working memory. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106: 22552–22557

- Nelson PT, Alafuzoff I, Bigio EH, Bouras C, Braak H, et al. (2012) Correlation of Alzheimer disease neuropathologic changes with cognitive status: a review of the literature. *J Neuropathol Exp Neurol*, 71: 362–381
- Neve DL, McPhie YC (2000) Alzheimer's disease: a dysfunction of the amyloid precursor protein. *Brain Res*, 886: 54–61
- North American Nursing Diagnosis Association (NANDA) International: Nursing Diagnoses, definitions and classification. Ed. Elsevier. 2009–2011
- Novati A, Hulshof HJ, Koolhaas JM, Lucassen PJ, Meerlo P (2011) Chronic sleep restriction causes a decrease in hippocampal volume in adolescent rats, which is not explained by changes in glucocorticoid levels or neurogenesis. *Neuroscience*, 190: 145–155
- Nyberg L, Bäckman L (2010) Memory Changes and the Aging Brain A Multimodal Imaging Approach, en *Handbook of the Psychology of Aging*. Ed: Academic Press, 2005, pp. 121–132
- Nyberg L, Dahlin E, Stigsdotter Neely A, Backman L (2009) Neural correlates of variable working memory load across adult age and skill: dissociative patterns within the frontoparietal network. *Scand J Psychol*, 50: 41–46
- O'Keefe J, Nadel L (1978) The hippocampus as a cognitive map. *Oxford: Clarendon Press*
- Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kaye R, Metherate R, Mattson MP, Akbari Y, LaFerla FM (2003) Triple–transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular A β and synaptic dysfunction. *Neuron*, 39: 409–421
- Ohayon MM, Carskadon MA, Guilleminault C, Vitiello MV (2004). Meta–analysis of quantitative sleep parameters from childhood to old age in healthy individuals: developing normative sleep values across the human lifespan. *Sleep*, 27: 1255–1273
- Olabarria M, Noristani HN, Verkhatsky A, Rodríguez JJ (2011) Age–dependent decrease in glutamine synthetase expression in the hippocampal astroglia of the triple transgenic Alzheimer's disease mouse model: mechanism for deficient glutamatergic transmission? *Mol Neurodegen*, 6: 55–64
- Olbrich D, Dittmar M (2012) The cortisol awakening response is related with PERIOD1 clock gene expression in older women. *Exp Gerontol*, 47: 527–533
- Oliveira AMM, Hawk JD, Abel T, Havekes R (2010) Post–training reversible inactivation of the hippocampus enhances novel object recognition memory. *Learn Mem*, 17: 155–160
- Olton DS, Samuelson RJ (1976) Remembrance of places passed: Spatial memory in rats. *J Exp Psychol Anim Behav Proc*, 2: 97–116
- Omran AR (1971) The epidemiological transition: a theory of the epidemiology of population change. *Milbank Mem Fund Q*, 49: 509–538

- Opp MR (1995) Corticotropin–releasing hormone involvement in stressor–induced alterations in sleep and in the regulation of waking. *Adv Neuroimmunol*, 5: 123–143
- Organización Mundial de la Salud. Global Health Statistics Report, part III: Global Health Indicators, 2009.
- Otalora BB, Vivanco P, Madariaga AM, Madrid JA, Rol MA (2010) Internal temporal order in the circadian system of a dual–phasing rodent, the *Octodon deguss*. *Chronobiol Int*, 27: 1564–1579
- Pace–Schott EF, Milad MR, Orr SP, Rauch SL, Stickgold R, Pitman RK (2009) Sleep promotes generalization of extinction of conditioned fear. *Sleep*, 32: 19–26
- Pandi–Perumal SR, Srinivasan V, Maestroni GJ, Cardinali DP, Poeggeler B, Hardeland R (2006) Melatonin: Nature's most versatile biological signal? *FEBS J*, 273: 2813–2838
- Paoletti P, Neyton J (2007) NMDA receptor subunits: function and pharmacology. *Curr Opin Pharmacol*, 7: 39–47
- Park CR, Campbell AM, Diamond DM (2001) Chronic psychosocial stress impairs learning and memory and increases sensitivity to yohimbine in adult rats. *Biol Psychiatry*, 50: 994–1004
- Park DC, Reuter–Lorenz P (2009) The adaptive brain: aging and neurocognitive scaffolding. *Annu Rev Psychol*, 60: 173–196
- Pascual M, Baliño P, Alfonso–Loeches S, Aragón CM, Guerri C (2011) Impact of TLR4 on behavioral and cognitive dysfunctions associated with alcohol–induced neuroinflammatory damage. *Brain Behav Immun*, 25: S80–S91
- Patil SS, Sunyer B, Hoger H, Lubec G (2009) Evaluation of spatial memory of C57BL/6J and CD1 mice in the Barnes maze, the Multiple T–maze and in the Morris water maze. *Behav Brain Res*, 198: 58–68
- Patti CL, Zanin KA, Sanday L, Kameda SR, Fernandes–Santos L, Fernandes HA, Andersen ML, Tufik S, Frussa–Filho R (2010) Effects of sleep deprivation on memory in mice: role of state–dependent learning. *Sleep*, 33: 1669–1679
- Perez M, Cuadros R, Benitez MJ, Jimenez JS (2004) Interaction of Alzheimer's disease amyloid β peptide fragment 25–35 with tau protein, and with a tau peptide containing the microtubule binding domain. *J Alzheimers Dis*, 6: 461–467
- Perez–García G, Meneses A (2005) Oral administration of the 5–HT₆ receptor antagonists SB–357134 and SB–399885 improves memory formation in an autoshaping learning task. *Pharmacol Biochem Behav*, 81: 673–682
- Pilz KS, Konar Y, Vuong QC, Bennett PJ, Sekuler AB (2011) Age–related changes in matching novel objects across viewpoints. *Vision Res*, 51: 1958–1965

- Pimentel-Coelho PM, Michaud JP, Rivest S (2013) Effects of mild chronic cerebral hypoperfusion and early amyloid pathology on spatial learning and the cellular innate immune response in mice. *Neurobiol Aging*, 34: 679–693
- Podell J, Sambataro F, Murty V, Emery M, Tong Y, Das S, Goldberg T, Weinberger D, Mattay V (2012) Neurophysiological correlates of age-related changes in working memory updating. *Neuroimage*, 62: 2151–2160
- Polzella DJ (1975) Effects of sleep deprivation on short-term recognition memory. *J Exp Psychol*, 104: 194–200
- Popović N, Madrid JA, Rol MA, Caballero-Bleda M, Popović M (2010) Barnes maze performance of *Octodon degus* is gender dependent. *Behav Brain Res*, 212: 159–167
- Price JL, Ko AI, Wade MJ, Tsou SK, McKeel DW, Morris JC (2001) Neuron number in the entorhinal cortex and CA1 in preclinical Alzheimer disease. *Arch Neurol*, 58: 1395–1402
- Proctor DT, Coulson EJ, Dodd PR (2011) Post-synaptic scaffolding protein interactions with glutamate receptors in synaptic dysfunction and Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol*, 93: 509–521
- Reger ML, Hovda DA, Giza CC (2009) Ontogeny of rat recognition memory measured by the novel object recognition task. *Inc Dev Psychobiol*, 51: 672–678
- Regland B, Gottfries CG (1992) The role of amyloid β -protein in Alzheimer's disease. *Lancet*, 340: 467–469
- Reitz C (2012) Alzheimer's disease and the amyloid cascade hypothesis: a critical review. *Int J Alzheimers Dis*, 2012: 369808
- Reitz C, Cheng R, Rogava E et al. (2011a) Meta-analysis of the association between variants in SORL1 and Alzheimer disease. *Arch Neurol*, 68: 99–106
- Reitz C, Tokuhiro S, Clark LN et al. (2011b) SORCS1 alters amyloid precursor protein processing and variants may increase Alzheimer's disease risk. *Ann Neurol*, 69: 47–64
- Reyes AE, Chacón MA, Dinamarca MC, Cerpa W, Morgan C, Inestrosa NC (2004) Acetylcholinesterase- $A\beta$ complexes are more toxic than $A\beta$ fibrils in rat hippocampus: effect on rat β -amyloid aggregation, laminin expression, reactive astrocytosis and neuronal cell loss. *Am J Pathol*, 164: 2163–2174
- Richardson JC, Kendal CE, Anderson R, Priest F, Gower E, et al. (2003) Ultrastructural and behavioural changes precede amyloid deposition in a transgenic model of Alzheimer's disease. *Neuroscience*, 122: 213–228
- Ritchie K, Leibovici D, Ledéser B, Touchon J (1996) A typology of subclinical senescent cognitive disorder. *Br J Psychiatry*, 168: 470–476

- Roberson ED, Halabisky B, Yoo JW, Yao J, Chin J, et al. (2011) Amyloid- β /fyn-induced synaptic, network, and cognitive impairments depend on tau levels in multiple mouse models of Alzheimer's disease. *J Neurosci*, 31: 700–711
- Roberson ED, Scearce-Levie K, Palop JJ, Yan F, Cheng IH, Wu T, Gerstein H, Yu GQ, Mucke L (2007) Reducing endogenous tau ameliorates amyloid β -induced deficits in an Alzheimer's disease mouse model. *Science*, 316: 750–754
- Roberts GW, Gentleman SM, Lynch A, Murray L, Landon M, Graham DI (1994) β -Amyloid protein deposition in the brain after severe head injury: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 57: 419–425
- Rodrigue KM, Raz N (2004) Shrinkage of the entorhinal cortex over five years predicts memory performance in healthy adults. *J Neurosci*. 24: 956–963
- Rodríguez D, Formiga F, Fort I, Robles MJ, Barranco E, Cubí D (2012) Pharmacological treatment of dementia: When, how and for how long. Recommendations of the Working Group on Dementia of the Catalan Society of Geriatrics and Gerontology. *Rev Esp Geriatr Gerontol*, 47: 228–233
- Rodríguez-Gomez JA, de la Roza C, Machado A, Cano J (1995) The effect of age on the monoamines of the hypothalamus. *Mechan Ageing Develop*, 77: 185–195
- Rogaeva E, Meng Y, Lee JH et al. (2007) The neuronal sortilin-related receptor SORL1 is genetically associated with Alzheimer disease. *Nat Gen*, 39: 168–177
- Roh JH, Huang Y, Bero AW, Kasten T, Stewart FR, Bateman RJ, Holtzman DM (2012) Disruption of the Sleep-Wake Cycle and Diurnal Fluctuation of β -Amyloid in Mice with Alzheimer's Disease Pathology. *Sci Transl Med*, 4: 150ra122
- Rosen R, Fritz J, Dooyema J, Cintron A, Hamaguchi T, Lah J, Levine H, Jucker M, Walker L (2012) Exogenous seeding of cerebral β -amyloid deposition in β APP-transgenic rats. *J Neurochem*, 120: 660–666
- Ruat M, Traiffort E, Arrang JM, Tardivel-Lacombe J, Diaz J, Leurs R, Schwartz JC (1993) A novel rat serotonin (5-HT₆) receptor: molecular cloning, localization and stimulation of cAMP accumulation. *Biochem Biophys Res Commun*, 193: 268–276
- Russ TC, Morling JR. Cholinesterase inhibitors for mild cognitive impairment. En: The Cochrane Library. Ed: Cochrane Dementia and Cognitive Improvement Group, Vol. 9, 2012, CD009132
- Sabbagh MN, Shah F, Reid RT, Sue L, Connor DJ, Peterson LK, Beach TG (2006) Pathologic and nicotinic receptor binding differences between mild cognitive impairment, Alzheimer disease, and normal aging. *Arch Neurol*, 63: 1771–1776
- Sadowsky CH, Galvin JE (2012) Guidelines for the management of cognitive and behavioral problems in dementia. *J Am Board Fam Med*, 25: 350–366

- Sapolsky R, Krey L, McEwen BS (1985) Prolonged glucocorticoid exposure reduces hippocampal neuron number: Implications for aging. *J Neurosci*, 5: 1121–1127
- Sarkisyan G, Hedlund PB (2009) The 5-HT₇ receptor is involved in allocentric spatial memory information processing. *Behav Brain Res*, 202: 26–31
- Schechter LE, Lin Q, Smith DL, Zhang G, Shan Q, Platt B, Brandt MR, Dawson LA, Cole D, Bernotas R, Robichaud A, Rosenzweig-Lipson S, Beyer CE (2008) Neuropharmacological profile of novel and selective 5-HT₆ receptor agonists: WAY-181187 and WAY-208466. *Neuropsychopharmacology*, 33: 1323–1335
- Schliebs R, Arendt T (2011) The cholinergic system in aging and neuronal degeneration. *Behav Brain Res*, 221: 555–563
- Schmidt C, Peigneux P, Cajochen C (2012) Age-Related Changes in Sleep and Circadian Rhythms: Impact on Cognitive Performance and Underlying Neuroanatomical Networks. *Front Neur*, 3: 118
- Schmidt C, Peigneux P, Cajochen C (2012) Age-Related Changes in Sleep and Circadian Rhythms: Impact on Cognitive Performance and Underlying Neuroanatomical Networks. *Front Neur*, 3: art.118
- Schwartz MD, Mong JA (2011) Estradiol suppresses recovery of REM sleep following sleep deprivation in ovariectomized female rats. *Physiol Behav*, 104: 962–971
- Schwierin B, Borbely AA, Tobler I (1998). Sleep homeostasis in the female rat during the estrous cycle. *Brain Res*, 811: 96–104
- Seeger T, Fedorova I, Zheng F, Miyakawa T, Koustova E, Gomeza J, Basile AS, Alzheimer C, Wess J (2004) M2 muscarinic acetylcholine receptor knock-out mice show deficits in behavioral flexibility, working memory, and hippocampal plasticity. *J Neurosci*, 24: 10117–10127
- Segovia G, Porras A, Del Arco A, Mora F (2001) Glutamatergic neurotransmission in aging: a critical perspective. *Mech Ageing Dev*, 122: 1–29
- Selkoe DJ (2001a) Presenilins. β -amyloid precursor protein and the molecular basis of Alzheimer's disease. *Clin Neurosci Res*, 1: 91–103
- Selkoe DJ (2001b) Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev*, 81: 741–766
- Seubert P, Oltsdorf T, Lee MG, Barbour R, Blomquist C, Davis DL, Bryant K, Fritz LC, Galasko D, Thal LJ, Lieberburg I, Schenk D (1993) Secretion of beta-amyloid precursor protein cleaved at the amino terminus of the beta-amyloid peptide. *Nature*, 361: 260–263
- Seubert P, Vigo-Pelfrey C, Esch F, Lee M, Dovey H, Davis D, Sinha S, Schlossmacher M, Whaley J, Swindlehurst C, McCormack R, Wolfert R, Selkoe D, Lieberburg I, Schenk D (1992) Isolation

- and quantification of soluble Alzheimer's beta-peptide from biological fluids. *Nature*, 359: 325–327
- Sharma S, Rakoczy S, Brown–Borg H (2010) Assessment of spatial memory in mice. *Life Sci*, 87: 521–536
- Sheth B, Nguyen N, Janvelyan D (2009) Does sleep really influence face recognition memory? *PLoS ONE*, 4: e5496
- Sinha S, Lopes DH, Bitan G (2012) A Key Role for Lysine Residues in Amyloid β -Protein Folding, Assembly, and Toxicity. *ACS Chem Neurosci*, 3: 473–481
- Skene DJ, Swaab DF (2003) Melatonin rhythmicity: effect of age and Alzheimer's disease. *Exp Gerontol*, 38: 199–206
- Slooter AJ, Cruts M, Kalmijn S, Hofman A, Breteler MM, Van Broeckhoven C, van Duijn CM (1998) Risk estimates of dementia by apolipoprotein E genotypes from a population–based incidence study: the Rotterdam Study. *Arch Neurol*, 55: 964–968
- Small SA, Duff K (2008) Linking A–beta and tau in late–onset Alzheimer's disease: a dual pathway hypothesis. *Neuron*, 60: 534–542
- Small SA, Tsai WY, De La Paz R, Mayeux R, Stern Y (2002) Imaging hippocampal function across the human life span: is memory decline normal or not? *Ann Neurol*, 51: 290–295
- Smith C, Rose GM (1997) Post training paradoxical sleep in rats is increased after spatial learning in the Morris water maze. *Behav Neurosci*, 111: 1197–1204
- Smith CT, Conway JM, Rose GM (1998) Brief paradoxical sleep deprivation impairs reference, but not working, memory in the radial arm maze task. *Neurobiol Learn Mem*, 69: 211–217
- Snyder EM, Nong Y, Almeida CG, Paul S, Moran T, Choi EY, Nairn AC, Salter MW, Lombroso PJ, Gouras GK, Greengard P (2005) Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid–beta. *Nat Neurosci*, 8: 1051–1058
- Sodero AO, Weissmann C, Ledesma MD, Dotti CG (2011) Cellular stress from excitatory neurotransmission contributes to cholesterol loss in hippocampal neurons aging in vitro. *Neurobiol Aging*, 32: 1043–1053
- Sofroniew MV, Howe CL, Mobley WC (2000) Nerve growth factor signaling, neuroprotection, and neural repair. *Annu Rev Neurosci*, 24: 1217–1281
- Spires TL, Hyman BT (2005) Transgenic models of Alzheimer's disease: learning from animals. *NeuroRx*, 2: 423–437
- Spires TL, Orne JD, Santacruz K, Pitstick R, Carlson GA, Ashe KH, Hyman BT (2006) Region–specific dissociation of neuronal loss and neurofibrillary pathology in a mouse model of tauopathy. *Am J Pathol*, 168: 1598–1607

- Squire LR (2004) Memory systems of the brain: a brief history and current perspective. *Neurobiol Learn Mem*, 82: 171–177
- Squire LR, Zola-Morgan J (2011) The cognitive neuroscience of human memory since H.M. *Annu Rev Neurosci*, 34: 259–288
- Steele ML, Robinson SR (2012) Reactive astrocytes give neurons less support: implications for Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 33: 423.e1–423.e13
- Stewart MG, Davies HA, Sandi C, Kraev IV, Rogachevsky VV, Peddie CJ, Rodriguez JJ, Cordero MI, Donohue HS, Gabbott PL, Popov VI (2005) Stress suppresses and learning induces plasticity in CA3 of rat hippocampus: A three-dimensional ultrastructural study of thorny excrescences and their postsynaptic densities. *Neuroscience* 131:43–54
- Stewart S, Cacucci F, Lever C (2011) Which memory task for my mouse? A systematic review of spatial memory performance in the Tg2576 Alzheimer's mouse model. *J Alzheimers Dis*, 26: 105–126
- Stott DJ (2006) Cognitive decline in ageing. *Asian J Gerontol Geriatr*, 1: 21–25
- Sumiyoshi T, Park S, Jayathilake K, Roy A, Ertugrul A, Meltzer HY (2007) Effect of buspirone, a serotonin1A partial agonist, on cognitive function in schizophrenia: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Schizophr Res*, 95: 158–168
- Sunanda Rao BSS, Raju TR (2000) Chronic restraint stress impairs acquisition and retention of spatial memory task in rats. *Curr Sci*, 79: 1581–1584
- Suri D, Veenit V, Sarkar A, Thiagarajan D, Kumar A, Nestler E, Galande S, Vaidya VA (2013) Early Stress Evokes Age-Dependent Biphasic Changes in Hippocampal Neurogenesis, Bdnf Expression, and Cognition. *Biol Psychiatry* [Epub ahead of print]
- Takashima A (2008) Hyperphosphorylated tau is a cause of neuronal dysfunction in tauopathy. *J Alzheimers Dis*, 14: 371–375
- Takashima A, Honda T, Yasutake K, Michel G, Murayama O, Murayama M, Ishiguro K, Yamaguchi H (1998) Activation of tau protein kinase I/glycogen synthase kinase-3 beta by amyloid beta peptide (25:35) enhances phosphorylation of tau in hippocampal neurons. *Neurosci Res*, 31: 317–323
- Tamaki K, Yamada K, Nakamichi N, Taniura H, Yoneda Y (2008) Transient suppression of progenitor cell proliferation through NMDA receptors in hippocampal dentate gyrus of mice with traumatic stress experience. *J Neurochem*, 105: 1642–1655
- Tannenberg, R.K., Scott, H.L., Westphalen, R.I., Dodd, P.R., 2004. The identification and characterization of excitotoxic nerve-endings in Alzheimer disease. *Curr Alzheimer Res*, 1: 11–25

- Tiraboschi P, Hansen LA, Alford M, Masliah E, Thal LJ, Corey-Bloom J (2000) The decline in synapses and cholinergic activity is asynchronous in Alzheimer's disease. *Neurology*, 55: 1278–1283
- Tobler I, Deboer T, Fischer M (1997) Sleep and sleep regulation in normal and prion protein-deficient mice. *J Neurosci*, 17: 1869–1879
- Treusch S, Hamamichi S, Goodman JL, et al. (2011) Functional links between A β toxicity, endocytic trafficking, and Alzheimer's disease risk factors in yeast. *Science*, 334: 1241–1245
- Truchot L, Costes N, Zimmer L, Laurent B, Le Bars D, Thomas-Antérion C, Mercier B, Hermier M, Vighetto A, Krolak-Salmon P (2008) A distinct [18F]MPPF PET profile in amnesic mild cognitive impairment compared to mild Alzheimer's disease. *Neuroimage*, 40: 1251–1256
- Tsang SW, Vinters HV, Cummings JL, Wong PT, Chen CP, Lai MK (2008) Alterations in NMDA receptor subunit densities and ligand binding to glycine recognition sites are associated with chronic anxiety in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 29: 1524–1532
- Tulving E (2002) Episodic memory: from mind to brain. *Annu Rev Psychol*, 53: 1–25
- Uchida S, Hotta H, Misawa H, Kawashima K (2011) Sustained subcutaneous infusion of nicotine enhances cholinergic vasodilation in the cerebral cortex induced by stimulation of the nucleus basalis of Meynert in rats. *Eur J Pharmacol*, 654: 235–240
- Ulrich-Lai YM, Herman JP (2009) Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nat Rev Neurosci*, 10: 397–409
- van Groen T, Kadish I, Popović N, Popović M, Caballero-Bleda M, Baño-Otálora B, Vivanco P, Rol MÁ, Madrid JA (2011) Age-related brain pathology in *Octodon degu*: blood vessel, white matter and Alzheimer-like pathology. *Neurobiol Aging*, 32: 1651–1661
- Van Reeth O, Hinch D, Tecco JM, Turek FW (1991) The effects of short periods of immobilization on the hamster circadian clock. *Brain Res*, 545: 208–214
- Vanderwolf CH (1987) Near-total loss of learning and memory as a result of combined cholinergic and serotonergic blockade in the rat. *Behav Brain Res*, 23: 43–57
- Vanguilder HD, Bixler GV, Sonntag WE, Freeman W (2012) Hippocampal expression of myelin-associated inhibitors is induced with age-related cognitive decline and correlates with deficits of spatial learning and memory. *J Neurochem*, 121: 77–98
- Vertes RP (2004) Memory consolidation in sleep; dream or reality. *Neuron*, 44: 135–148
- Vitiello MV, Larsen LH, Moe KE (2004) Age-related sleep change: Gender and estrogen effects on the subjective-objective sleep quality relationships of healthy, noncomplaining older men and women. *J Psychosom Res*, 56: 503–510

- Vitiello, MV, Borson S (2001) Sleep disturbances in patients with Alzheimer's disease: epidemiology, pathophysiology and treatment. *CNS Drugs*, 15: 777–796
- Vivanco P, López–Espinoza A, Madariaga AM, Rol MA, Madrid JA (2010) Nocturnalism induced by scheduled feeding in diurnal *Octodon degus*. *Chronobiol Int*, 27: 233–250
- Voderholzer U, Piosczyk H, Holz J, Landmann N, Feige B, Loessl B, Kopasz M, Doerr JP, Riemann D, Nissen C (2011) Sleep restriction over several days does not affect long–term recall of declarative and procedural memories in adolescents. *Sleep Med*, 12: 170–178
- Waldemar G, Phung KT, Burns A, Georges J, Hansen FR, Iliffe S, Marking C, Rikkert MO, Selmes J, Stoppe G, Sartorius N (2007) Access to diagnostic evaluation and treatment for dementia in Europe. *Int J Geriatr Psychiatry*, 22: 47–54
- Walker M, Stickgold R (2006) Sleep, memory, and plasticity. *Annu Rev Psychol*, 57: 139–166
- Walker MP (2009) The role of sleep in cognition and emotion. *Ann N Y Acad Sci*, 1156: 168–197
- Wallace WC, Bragin V, Robakis NK, Sambamurti K, VanderPutten D, Merrill CR, Davis KL, Santucci AC, Haroutunian V (1991) Increased biosynthesis of Alzheimer amyloid precursor protein in the cerebral cortex of rats with lesions of the nucleus basalis of Meyner. *Mol Brain Res*, 10: 173–178
- Walton HS, Dodd PR (2007) Glutamate–glutamine cycling in Alzheimer's disease. *Neurochem Int*, 50: 1052–1066
- Wang Q, Zengin A, Ying W, Newell KA, Wang P, Yeo W, Wong PT, Yenari MA, Huang XF (2008) Chronic treatment with simvastatin upregulates muscarinic M1/4 receptor binding in the rat brain. *Neuroscience*, 154: 1100–1106
- Wang W, Li S, Dong HP, Lv S, Tang YY (2009) Differential impairment of spatial and nonspatial cognition in a mouse model of brain aging. *Life Sci*, 85: 127–135
- West PJ, Marcy VR, Marino MJ, Schaffhauser H (2009) Activation of the 5–HT(6) receptor attenuates long–term potentiation and facilitates GABAergic neurotransmission in rat hippocampus. *Neuroscience*, 164: 692–701
- Wilson RS, Schneider JA, Boyle PA, Arnold SE, Tang Y, Bennett DA (2007) Chronic distress and incidence of mild cognitive impairment. *Neurology*, 68: 2085–2092
- Wyss–Coray T, Yan F, Lin AH, Lambris JD, Alexander JJ, Quigg RJ, Masliah E (2002) Prominent neurodegeneration and increased plaque formation in complement–inhibited Alzheimer's mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99: 10837–10842
- Xiong H, McCabe L, Costello J, Anderson E, Weber G, Ikezu T (2004) Activation of NR1a/NR2B receptors by soluble factors from APP–stimulated monocyte– derived macrophages: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 25: 905–911

- Xu Y, Yan J, Zhou P, Li J, Gao H, Xia Y, Wang Q (2012) Neurotransmitter receptors and cognitive dysfunction in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Prog Neurobiol*, 97: 1–13
- Yan R, Bienkowski MJ, Shuck ME, Miao H, Tory MC, Pauley AM, Brashier JR, Stratman NC, Mathews WR, Buhl AE, Carter DB, Tomasselli AG, Parodi LA, Heinrikson RL, Gurney ME (1999) Membrane– anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease β – secretase activity. *Nature*, 402: 533–537
- Yang Y, Zheng X, Wang Y, Cao J, Dong Z, Cai J, Sui N, Xu L (2008) Stress enables synaptic depression in CA1 synapses by acute and chronic morphine: possible mechanisms for corticosterone on opiate addiction. *J Neurosci*, 24: 2412–2420
- Yankner BA, Lu T, Loerch P (2008) The aging brain. *Annu Rev Pathol*. 3: 41–66
- Yasuno F, Suhara T, Nakayama T, Ichimiya T, Okubo Y, Takano A, Ando T, Inoue M, Maeda J, Suzuki K (2003) Inhibitory effect of hippocampal 5–HT_{1A} receptors on human explicit memory. *Am J Psychiatr*, 160: 334–340
- Zhang Y, Thompson R, Zhang H, Xu H (2011) APP processing in Alzheimer's disease. *Mol Brain*, 4: 3
- Zheng H, Jiang M, Trumbauer ME, Sirinathsinghji DJ, Hopkins R, Smith DW, Heavens RP, Dawson GR, Boyce S, Conner MW (1995) Beta– amyloid precursor protein–deficient mice show reactive gliosis and decreased locomotor activity. *Cell*, 81: 525–531