

MODELOS ANIMALES NO TRANSGÉNICOS DE DEMENCIA. CONSIDERACIONES METODOLÓGICAS Y RELEVANCIA FARMACOLÓGICA

Maylin Wong-Guerra¹, Gilberto L. Pardo-Andreu², Yanier Nuñez-Figueroa^{1*}

¹Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos, Ave 26, No. 1605 Boyeros y Puentes Grandes, CP 10600, La Habana, Cuba

²Centro de Estudio para las Investigaciones y Evaluaciones Biológicas, Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de La Habana, Ave. 23 # 21425 e/214 y 222, La Coronela, La Lisa, CP 13600, La Habana, Cuba

*Autor para correspondencia: Yanier Nuñez-Figueroa e-mail: yaniernf@infomed.sld.cu

Resumen

La demencia es un síndrome que repercute negativamente en la calidad de vida de los pacientes y sus familiares, con elevado costo social y económico. Una extensiva revisión de la incidencia actual de la enfermedad mostró que más de 36 millones de personas viven con demencia en todo el mundo, con aproximadamente 4.6 millones de nuevos casos cada año. En el campo de las neurociencias conductuales, los modelos animales suponen la mejor alternativa para estudiar las múltiples alteraciones fisiopatológicas asociadas a los trastornos de la memoria y el aprendizaje, así como para la investigación de nuevas estrategias terapéuticas. El principal objetivo de este trabajo es proporcionar una revisión de los principales modelos experimentales no transgénicos de disfunción conductual que se han desarrollado para la investigación de la demencia en condiciones *in vivo*, además de mencionar las principales alteraciones bioquímicas y estructurales observadas en cada uno de ellos.

Palabras clave: demencia, cambios bioquímicos-estructurales-conductuales, modelos experimentales *in vivo*

NON-TRANSGENIC ANIMAL MODELS OF DEMENTIA. METHODOLOGICAL CONSIDERATIONS AND PHARMACOLOGICAL RELEVANCE

Abstract

Dementia is a syndrome with negative implications to the quality of life of patients and their families, and with a high social and economic cost. An extensive revision showed that more than 36 million people live with dementia worldwide, with approximately 4.6 million new cases every year. In behavioral neurosciences field, animal models are the best alternative to study the multiple pathophysiological alterations associated with the dysfunctions of memory and learning, as well as to search for new therapeutic strategies. The aim of this work is to provide a review of the main types of non-transgenic animal models of behavioral dysfunctions, used for dementia-related research and

therapeutics. The revision also includes the main biochemical and structural alterations observed in each experimental model.

Keywords: dementia, biochemical-structural-behavioral changes, experimental models *in vivo*

Introducción

La demencia se define como la pérdida progresiva de las funciones cognitivas, como resultado de la disfunción y la muerte de células del sistema nervioso central y periférico. Se manifiesta por la disminución progresiva de la capacidad de adquirir nuevos conocimientos y la propensión a olvidar lo aprendido (1-3). Las áreas del cerebro más comúnmente afectadas son el hipocampo, las áreas motoras primaria y somatosensorial, algunas estructuras del sistema límbico, las cortezas parieto-temporal, frontal y entorrinal (1). Entre las enfermedades neurodegenerativas que cursan con demencia destaca la enfermedad de Alzheimer como la más frecuente, seguida de la demencia vascular, la demencia por cuerpos de Lewy y demencia asociadas a otras enfermedades degenerativas y de origen viral como el Parkinson, Huntington, Pick, Creutzfeld-Jakob, y el SIDA (1). En el año 2009, una extensiva revisión de la incidencia mundial de esta patología reveló que aproximadamente 36 millones de personas vivían con algún tipo de demencia y que cada año se registran alrededor de 4.6 millones de nuevos casos, valores que van en aumento a la par de la tendencia mundial hacia una población envejecida. En Cuba, la incidencia de la demencia en adultos es elevada alcanzando hasta un 10.2%, para un total promedio de 1.1% del total de habitantes (2). La demencia es una de las principales causas de discapacidad y dependencia en adultos mayores, con una relevante implicación social y elevados costos a la economía (1, 2). En este sentido, resulta necesario contribuir con la investigación preclínica y clínica de los mecanismos fisiopatológicos implicados en la aparición y progresión de los distintos tipos de demencia, con el objetivo de identificar nuevos candidatos terapéuticos. Varios modelos experimentales *in vivo* se han desarrollado con este fin. En este artículo se abordan aspectos fundamentales de los modelos animales no transgénicos más empleados para el estudio de la demencia, así como los principales mecanismos fisiopatológicos involucrados.

Fisiopatología general de la demencia

Las enfermedades neurodegenerativas que cursan con demencia, a pesar de su etiología tan diversa, se caracterizan por presentar déficits cognoscitivos múltiples que implican deterioro de la memoria y dificultad en el aprendizaje de información nueva, además de otras alteraciones cognoscitivas (afasia, apraxia, agnosia) (3-5). Aun así, el daño inicial que desencadena el curso de la enfermedad es específico para cada uno de los tipos de demencia, y en consecuencia, los eventos moleculares y estructurales que la sustentan. Además, se considera que la situación de estrés oxidativo inherente al envejecimiento y la glicosilación proteica pueden explicar algunos aspectos de esta enfermedad.

Dentro de las patologías que cursan con mayor deterioro cognitivo se encuentra la enfermedad de Alzheimer, que se caracteriza por una muerte neuronal regionalizada en áreas relacionadas con la memoria, unida a la acumulación extra e intracelular de agregados proteicos filamentosos que forman agregados neurofibrilares, placas amiloides neuríticas y amiloidosis cerebrovascular (6, 7). Como factores primarios desencadenantes de esta patogénesis, se han propuesto: el metabolismo anormal de la proteína β -amiloide que forma las placas amiloides en forma de conglomerados extracelulares, la hiperfosforilación de las proteínas tau del citoesqueleto que se agrega formando ovillos neurofibrilares en el interior de las neuronas y el genotipo anormal de la apolipoproteína E (6, 7). Estos cambios estructurales generan disminución y pérdida de la densidad sináptica, dificultan la neurotransmisión y propician la neurodegeneración (6). La demencia vascular es el segundo tipo de demencia más frecuente (1, 2). Su causa primaria es la enfermedad cerebrovascular múltiple, que afecta los vasos de pequeño y mediano calibre produciendo lesiones en el parénquima cerebral en forma múltiple y extensa (3). Anatómicamente se observan cambios en la sustancia gris, así como en diversos núcleos y regiones subcorticales con desmielinización y gliosis. En los vasos suele encontrarse oclusión por placas arterioscleróticas o por tromboembolias (3, 8). Otra de las demencias de mayor incidencia es la llamada demencia por cuerpos de Lewy, la cual presenta particularidades clínicas y neuropatológicas propias de la enfermedad de Alzheimer y de Parkinson. La demencia por cuerpos de Lewy se caracteriza por un metabolismo proteico anormal que crea fenotipos patogénicos que involucran particularmente al β -amiloide, la α -sinucleína y a la proteína tau; además de parálisis supranuclear progresiva y degeneración cortico basal (9). Algunas de estas proteínas anormales y otras, forman los llamados cuerpos de Lewy que se depositan en el citoplasma de las neuronas, fundamentalmente de la corteza frontal, parietal y temporal, y de la sustancia negra, degenerándolas (9). Como en los otros tipos de demencia, su síntoma central es el decline progresivo de las capacidades cognoscitivas, en suficiente magnitud como para interferir con las funciones sociales normales de los pacientes (10). La enfermedad de Parkinson, representa el segundo trastorno neurodegenerativo por su frecuencia, situándose únicamente después de la enfermedad de Alzheimer. Junto a sus síntomas motores clásicos, aparecen alteraciones en la función cognitiva, en la expresión de las emociones y en la función autónoma (11, 12). Se ha propuesto que la demencia asociada a la enfermedad de Parkinson se debe a la degeneración de los sistemas ascendentes subcorticales con pérdida neuronal de los sistemas dopaminérgicos nigroestriales y de neuronas involucradas en las funciones cognoscitivas (13). Sin embargo, ninguna de estas alteraciones que se han encontrado diferencialmente en cada uno de los principales tipos de demencia, explican totalmente las numerosas fases bioquímicas y patológicas de la enfermedad relacionadas con la disminución de la capacidad de aprendizaje y la pérdida progresiva de la memoria. En este sentido,

fomentar las investigaciones básicas y sobre todo, empleando modelos animales que mimeticen el deterioro cognitivo asociado a estas enfermedades, podrían contribuir a explicar muchas de las interrogantes actuales y desarrollar terapias efectivas.

Modelos animales de demencia

En el campo de las neurociencias de la conducta, tales como la neurociencia cognitiva y la neurobiología, los modelos animales han permitido investigar la relación entre el cerebro y la conducta. El objetivo más general de estas ciencias radica en ampliar los conocimientos existentes en cuanto a la conducta humana normal y anormal, con la expectativa de poder dilucidar los procesos neuronales que justifican el comportamiento. Diferentes modelos animales de disfunción conductual, asociada a la pérdida de la memoria y capacidad de aprendizaje, se han desarrollado con el propósito de esclarecer cuales alteraciones neurobioquímicas y conductuales patológicas justifican la aparición y progresión de la demencia en los humanos, así como para la investigación de nuevas estrategias terapéuticas (14). El diseño de un modelo experimental de demencia supone considerar características esenciales relacionadas con el nivel de afectación conductual y neuropatológico, en correspondencia con los objetivos de la investigación. Un modelo animal adecuado de demencia debe: 1) poder desarrollarse preferencialmente en individuos adultos, ya que es una enfermedad de mayor prevalencia en la adultez, y de modo que pueda partirse del estado inicial sano, 2) en contraste, desarrollarse a partir de mutaciones génicas puntuales responsables de algunas de las alteraciones demostradas de la enfermedad, 3) exhibir deterioro cognitivo y neurobiológico progresivo, 4) ser producido a partir de un daño específico, que afecte mayoritariamente las estructuras y conexiones cerebrales relacionadas con la memoria y el aprendizaje, 5) la lesión debe ser reproducible y simular adecuadamente una o varias de las alteraciones biológicas y clínicas observadas en humanos, (6) el daño neurobiológico debe poder medirse con parámetros morfológicos, fisiológicos, bioquímicos o de conducta. En este sentido, se han desarrollado modelos animales transgénicos y farmacológicos, útiles en investigaciones de enfermedades que cursan con demencia. Ambos tipos de modelos han sido desarrollados empleando mayoritariamente roedores, y especialmente en función de manifestar las características de la enfermedad de Alzheimer como la demencia de mayor prevalencia a nivel mundial (14-16). Los modelos transgénicos han reportado información valiosa sobre el impacto de modificaciones génicas puntuales (sobrexpresión de β -amiloide, hiperfosforilación de la proteína tau, expresión de apoE- ϵ 4, y otras) en el estado cerebral y la conducta animal (14, 15). Sin embargo, han sido cuestionados en lo relacionado a la factibilidad de su empleo cuando se desea estudiar la enfermedad a partir de individuos inicialmente sanos, la influencia de alteraciones del metabolismo energético cerebral en la etiología y progresión de la demencia, o la importancia específica de cualquiera de los sistemas de neurotransmisión cerebrales

en los procesos de aprendizaje y memoria (14, 17, 18). Sumado a estas desventajas para comprobar algunas hipótesis, está el elevado costo de los animales transgénicos que encarecen considerablemente las investigaciones neuroconductuales. En contraste, se han desarrollado varios modelos animales que manifiestan daños cognoscitivos, bioquímicos, fisiológicos y morfológicos característicos de demencia inducidos farmacológicamente. Estos modelos experimentales permiten estudiar algunos de los aspectos más relevantes de la demencia, que no pueden ser analizados mediante el empleo de animales transgénicos (16-18). Entre los más reportados por los investigadores que estudian los desórdenes cognoscitivos están: modelo de desajuste colinérgico inducido por escopolamina, modelo de resistencia cerebral a la insulina inducido por administración de estreptozotocina intracerebroventricular (19), modelo de déficit cognitivo inducido por aluminio (20), y modelo de administración intracerebroventricular de β -amiloide (18).

Los requerimientos de un modelo para la investigación varían según su uso. Cuando se estudia la fisiopatología de la enfermedad lo más conveniente es eliminar todo excepto la variable de interés. Por el contrario, cuando se desea evaluar el efecto de un nuevo tratamiento, es recomendable emplear un modelo que represente la mayor cantidad posible de aspectos de la enfermedad, de modo que sea posible analizar el rango de efectos farmacológicos y detectar eventos adversos que pueden no ser apreciables en un modelo más limitado. No obstante, los modelos limitados a un daño específico también son útiles para evaluar una nueva terapia, cuando lo que se desea es discernir la especificidad del mecanismo de acción de su efecto. Entonces, como los modelos animales pueden ser usados de diferentes formas es importante tener claras las preguntas experimentales que desean responderse y cómo un modelo puede contribuir a ello (21). A pesar de las numerosas ventajas que reportan cada uno de los modelos experimentales que hasta la fecha se han desarrollado, ninguno de ellos ha logrado representar todos los aspectos fisiopatológicos que se manifiestan en la demencia de humanos. Aun así constituyen una herramienta imprescindible para las investigaciones preclínicas en el desarrollo de nuevas terapias para el tratamiento de la enfermedad. A continuación describiremos los aspectos fundamentales de los modelos más empleados en la literatura, para la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas para diferentes tipos de demencia.

Modelo de demencia inducido por escopolamina

La escopolamina es el compuesto de referencia más empleado para inducir déficit cognitivo asociado a la demencia y el envejecimiento en el campo de la neuropsicofarmacología (16, 22). El uso de este antagonista competitivo no selectivo de los receptores colinérgico muscarínicos, se sugiere como la vía más efectiva de bloquear la neurotransmisión colinérgica (16, 23). La disminución de la integridad colinérgica se asocia con déficit en el aprendizaje y la memoria en roedores y humanos, con mayor impacto en el proceso de adquisición de conocimientos y en la memoria anterógrada (16, 23-25). Se

ha reportado que, a partir del bloqueo primario de la neurotransmisión colinérgica, se producen alteraciones puntuales que en su conjunto son las responsables de la disfunción en la memoria que se observa en las diferentes pruebas conductuales. La escopolamina reduce la expresión del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) (del inglés, brain-derived neurotrophic factor), neurotrofina clave en la plasticidad sináptica durante los procesos de formación de la memoria (26, 27). Afecta el desarrollo dendrítico durante la neurogénesis de células granulares del giro dentado del hipocampo, que deteriora el circuito hipocampal (28). Varios reportes indican que, después del tratamiento con escopolamina, la actividad de la enzima acetilcolinesterasa (AChE) se incrementa considerablemente en el hipocampo, lo cual se ha relacionado con las anomalías en la neurogénesis de esta zona (28-30). El estrés oxidativo es otro de los efectos tóxicos de la administración de escopolamina, que promueve la apoptosis (31) y la disminución de la proliferación neuronal (26, 27). Después del tratamiento con escopolamina se ha observado disminución de la actividad de las enzimas del sistema antioxidante intrínseco superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx) y catalasa (CAT); y aumento de los niveles de malondialdehído (MDA) (27, 28, 31). Se ha reportado también que la escopolamina afecta el metabolismo energético en el cerebro: reduce los niveles de ATP en la corteza cerebral de ratas (32, 33), disminuye la actividad de la Na^+/K^+ ATPasa y la Ca^{2+} ATPasa en corteza cerebral e hipocampo(34) y provoca disfunción mitocondrial (35, 36). Otros estudios han demostrado que la escopolamina induce muerte apoptótica en neuronas del hipocampo mediante la activación de diversas señales pro apoptóticas (28, 31, 37). Estos fenómenos tienen un impacto importante en los procesos de memoria y en la patogénesis de demencias de tipo neurodegenerativas, como el Alzheimer (36, 38) y la asociada al Parkinson (39, 40). En línea con esto, se sugiere que los efectos deletéreos de esta droga en el sistema cognoscitivo están relacionados con el desacoplamiento inicial de las señales colinérgicas, desbalance de neurotransmisores excitatorios/inhibitorios, depleción de la energía neuronal y prevalencia del estado oxidativo que conducen a la muerte de las neuronas colinérgicas y a la pérdida de conexiones sinápticas.

El modelo de déficit cognitivo inducido por escopolamina permite estudiar el efecto de candidatos terapéuticos (colino miméticos y no colino miméticos) en los diferentes procesos de formación de la memoria: adquisición, consolidación-almacenamiento y recuperación (16, 41-43). Dichos estudios se han realizado en ratas, ratones, gerbos de Mongolia, palomas y monos, aunque de forma general predominan las evaluaciones preclínicas en roedores (16). El efecto amnésico y desacoplador de la escopolamina en los diferentes procesos de establecimiento de la memoria se evidencia según la dosis y la vía de administración, con mayor prevalencia de la vía periférica sobre la central. Para estudiar el impacto de este compuesto y candidatos terapéuticos en cada uno de estos procesos, es

necesario también seleccionar pruebas conductuales que evalúen procesos cognoscitivos sensibles a los efectos de la escopolamina, y que se diseñen con fases de entrenamiento-evaluación bien delimitadas. Los efectos conductuales más clásicos son: incremento de la actividad locomotora, de la latencia de respuesta y escape; la disminución de la respuesta de evitación activa y pasiva, de reconocimiento de objetos, de alternación, de discriminación de estímulos, de la atención y ante el miedo condicionado; y errores en el establecimiento de la memoria de trabajo y de referencia (16). Para evaluar el efecto en la etapa de adquisición de la memoria, se administra la escopolamina antes de comenzar la fase de entrenamiento, preferentemente por vía intra-peritoneal (i.p), con dosis para ratones y ratas que varían entre 0.3 y 5.0 mg/kg (16, 25, 44). La inyección de escopolamina post-entrenamiento afecta presumiblemente los eventos de consolidación, con dosis para ratas que ascienden hasta los 100 mg/kg por vía i.p y subcutánea (s.c), siendo más efectivas las administraciones s.c (16, 25). Sin embargo, se logra desacoplamiento de los procesos de recuperación con la administración previa a la fase de evaluación de la retención de dosis inferiores a 12 mg/kg, siendo la vía i.p la más empleada (16, 44).

Por los resultados obtenidos por diferentes investigadores puede decirse que el efecto de la escopolamina es dosis dependiente, aunque la forma de la curva dosis-respuesta difiere entre pruebas conductuales (16). Tiene mayor impacto en los procesos de adquisición que en los de recuperación de la memoria; desacopla mejor la memoria a corto plazo que la memoria a largo plazo, y afecta más la memoria de trabajo que la memoria de referencia (16). Aunque las administraciones intracerebrales de escopolamina son empleadas como alternativa más segura para lograr un efecto preferentemente central, la vía i.p es actualmente la que más se reporta para evaluaciones preclínicas de fármacos. Una de las desventajas más relevantes de este modelo es la no selectividad de la unión de la escopolamina a su receptor colinérgico, por lo que además de los efectos conductuales relacionados con déficit cognitivo se observan otros como ansiedad, hiperlocomoción no asociada a disminución del aprendizaje, disminución de la velocidad de respuesta y dilatación de las pupilas (16, 45). Las dosis más bajas tienden a tener un efecto preferencialmente cognoscitivo, mientras que el uso de elevadas dosis afecta adicionalmente aspectos no cognitivos que interfieren directamente con la interpretación de pruebas de discriminación de estímulos, atención y memoria (16). Por esta razón, a pesar de que este modelo de déficit cognitivo inducido farmacológicamente es el más empleado para encontrar candidatos terapéuticos para el tratamiento de la demencia con efecto directo en la neurotransmisión colinérgica, o en alguno de los procesos que se desacoplan a partir del daño colinérgico inicial, no permite afectar específicamente sólo una de las vías cognitivas sin tanto impacto en otros eventos conductuales, de modo que permita relacionarse con mayor precisión el daño con efectos conductuales exclusivos de déficit cognitivo.

Modelo de demencia inducido por estreptozotocina intracerebroventricular

El modelo de déficit cognitivo inducido por estreptozotocina intracerebroventricular (i.c.v) se ha propuesto como uno de los más empleados para estudiar los cambios estructurales, bioquímicos y conductuales, característicos de procesos demenciales, particularmente de la enfermedad de Alzheimer esporádica (17, 19). La estreptozotocina (STZ) (2-deoxy-2-[3-(methyl-3-nitrosoureido)-D-glucopiranosal]) es una sustancia betacitotóxica, ampliamente utilizada para producir modelos experimentales de diabetes mellitus tipo I y II (46). Administrada por vía periférica y en altas dosis destruye las células beta pancreática secretoras de insulina en ratas adultos machos, mientras que múltiples administraciones de baja a moderadas dosis causa resistencia a la insulina por afectación al receptor de insulina y rutas de señalización (47, 48). La administración de STZ (i.c.v), en dosis bajas subdiabetogénicas, induce un estado de resistencia a la insulina en el cerebro (49-52), sin causar ninguno de los cambios metabólicos sistémicos de diabetes mellitus(19). Se ha propuesto que este estado de resistencia es causado por desensibilización de los receptores de insulina cerebrales, similar a lo que se exhibe en el cerebro de pacientes con Alzheimer o envejecidos (53). La insulina y sus receptores en el cerebro, se han relacionado directamente con el aumento de la cognición, en particular con la memoria espacial, mediante la regulación del ARNm de insulina y el incremento de receptores en la membrana sináptica del hipocampo (54, 55). Presumiblemente, la insulina estimula la entrada de glucosa en regiones específicas del cerebro, especialmente del hipocampo, lo cual está sustentado por la distribución de receptores de insulina y transportadores de glucosa en esta área en particular (56, 57). El efecto de la STZ (i.c.v) sobre la regulación de la entrada de glucosa a las neuronas provoca una disminución del metabolismo energético cerebral y de la síntesis de acetil CoA; y esto último resulta en una neurotransmisión colinérgica deficiente a consecuencia del decrecimiento en la actividad de la enzima colina acetil transferasa (ChAT) (58-60). Asociado al daño inicial, se instaura en el cerebro un estrés oxidativo crónico (61, 62) que contribuye al desbalance de neurotransmisores y conduce a la muerte neuronal, fenómenos que dificultan la conectividad sináptica necesaria para el establecimiento de la memoria. Se ha propuesto que el deterioro de la memoria se debe también a un daño directo en el sistema septohipocampal, lo cual se ha relacionado con la reducción de la actividad de la ChAT en el hipocampo (58), reducción del peso del septum en más de un 40% (63), disminución en el transporte del factor de crecimiento nervioso del hipocampo al septum (60), disminución de la expresión de BDNF en el hipocampo (64), activación de la microglía y deterioro específico del tracto mielinizado del fórnix, que en su conjunto interrumpen las conexiones entre el septum y el hipocampo (65, 66). Además la administración de STZ (i.c.v) induce la expresión de péptidos β -amiloides 1-40 y 1-42, así como variantes hiperfosforiladas de proteína tau (67). Todos

estos mecanismos influyen substancialmente en el deterioro de la memoria, equivalentes a la demencia por envejecimiento y enfermedad de Alzheimer(19, 68).

La administración i.c.v de STZ se ha realizado unilateral y bilateralmente, en los ventrículos laterales del cerebro (50, 51, 58, 60). La evidencia indica que la inyección bilateral causa mayor daño en la memoria en comparación con la unilateral que afecta preferencialmente las neuronas del fórnix y el cuerpo calloso (69), por lo que en los últimos años es la forma bilateral la más utilizada. De lo publicado hasta la fecha, se respalda que la STZ (i.c.v) induce similares efectos conductuales, bioquímicos y estructurales en ratas, ratones y monos, sugiriendo que este es un modelo estandarizado y reproducible de un estado cerebral de resistencia a insulina (17). En la mayoría de los estudios sobre el efecto de la STZ (i.c.v) en la memoria y en la búsqueda de candidatos terapéuticos para el tratamiento de diferentes tipos de demencia, se emplean ratas como principal modelo animal (19). El rango de dosis administrada varía de 1 a 3 mg/kg de peso corporal, inyectado de 1 a 3 veces en cada uno de los ventrículos laterales (19). La dosis y frecuencias de administración influyen considerablemente en: a) la magnitud del daño cognitivo, morfológico y bioquímico, b) el inicio de la manifestación del déficit cognitivo, medido por diferentes pruebas conductuales, c) el inicio de la manifestación de alteración de parámetros bioquímicos y morfológicos en las diferentes estructuras cerebrales, y d) sobre la velocidad de la progresión y en el tiempo de duración del daño (19). Las pruebas conductuales verifican la presencia de afectación cognitiva, a partir de 10 días posteriores a la primera administración de STZ, y se mantiene hasta aproximadamente 12 semanas. De forma similar ocurre con los parámetros neurobioquímicos y neuroestructurales (19). La edad de los animales en el momento de la administración de STZ aparentemente no influye en los diferentes parámetros de daño que se registran (50, 51, 65, 68, 69). Sin embargo, la variabilidad en la magnitud del efecto, en igualdad de condiciones experimentales, se observa en la susceptibilidad individual entre animales de una misma especie; variabilidad que es más común en unas especies y líneas que en otras (58, 70). En ratas, la línea Wistar es la más usadas, y en menor medida la Sprague-Dawley (66) o las Lewis (70). De forma general, a pesar del estrecho rango de dosis empleada y la elevada reproducibilidad de los diferentes tipos de daño, varios autores alegan que se observa cierta dosis dependencia en la administración de STZ (i.c.v) (51, 70, 71).

El modelo de STZ (i.c.v) permite estudiar el efecto de fármacos con una amplia variedad de actividades farmacológicas como posibles candidatos terapéuticos para el tratamiento de la demencia y la enfermedad de Alzheimer (17). Permite evaluar el efecto de drogas en una amplia gama de parámetros bioquímicos y estructurales que marcan el progreso de deterioro cognitivo a partir de animales inicialmente sanos. Tiene un marcado impacto en la memoria espacial, que es posiblemente

la más estudiada con este modelo de demencia a diferencia de otros que se emplean de manera más equilibrada en la evaluación de memoria de trabajo y espacial (17, 19).

Este modelo presenta demostradas ventajas sobre los modelos transgénicos, que en su inmensa mayoría presentan mutaciones específicas asociadas a la enfermedad de Alzheimer como caso particular de demencia. Las ventajas que más destacan son: a) no es necesario manipular uno o varios genes específicos, sino que se crea un estado cerebral que potencialmente induce la expresión/inhibición de genes relacionados con el daño, b) las alteraciones patológicas en el cerebro pueden iniciarse a voluntad del investigador a cualquier edad a partir de animales sanos, figurando lo que plantean algunas teorías de que la demencia y algunas enfermedades afines inician después de un evento deletéreo en cualquier momento de la vida, c) los cambios bioquímicos y estructurales, así como el déficit cognitivo asociado a dichos cambios, pueden seguirse desde el momento en que se le impone el daño al cerebro, de modo que puede estudiarse cuáles alteraciones neurocerebrales ocurren más frecuentemente en cada una de las etapas de las manifestaciones conductuales, y d) este modelo permite evaluar el efecto terapéutico de fármacos tanto en la prevención como en la remisión de la progresión de la enfermedad.

Modelo de demencia inducido por aluminio

Numerosos estudios han demostrado el potencial neurotóxico del aluminio (Al) en diferentes modelos experimentales animales, y en humanos en diferentes condiciones clínicas (72-74). Ha sido identificado como un factor contribuyente en la etiología y patología de diferentes desórdenes neurodegenerativos como la enfermedad de Alzheimer, la esclerosis lateral amiotrófica y la demencia asociada a la enfermedad de Parkinson (75, 76), ya que se ha constado su efecto en la inducción de cambios conformacionales de proteínas claves en la fisiopatología de dichas enfermedades (77-81). En particular, el efecto de la exposición de Al en el aprendizaje y la memoria ha cobrado especial atención en los últimos años. Varios estudios han demostrado que el Al produce déficit en el aprendizaje en animales adultos (82, 83), lo cual ha permitido emplearlo como un modelo experimental adecuado para el estudio de mecanismos neuropatológicos implicados en el desarrollo de enfermedades que cursan con demencia, así como en la búsqueda de candidatos terapéuticos para su prevención y tratamiento (20, 84, 85).

A pesar de los numerosos estudios referentes al tema, es poco conocido el mecanismo molecular de los posibles efectos de la exposición de Al en el aprendizaje y la memoria. Sin embargo, se han podido identificar diversas afectaciones estructurales y bioquímicas que se han asociado con el déficit cognitivo. El Al se acumula preferentemente en determinadas áreas del cerebro, incluyendo el hipocampo que está directamente relacionada con los eventos sinápticos del aprendizaje y la memoria (86-88). Se ha reportado que influye en más de 200 reacciones biológicas cruciales para el

desarrollo y funcionamiento del cerebro, que causan varios efectos adversos en el sistema nervioso central (89). Entre las más relevantes están la síntesis de neurotransmisores, la transmisión sináptica, la expresión de genes, fosforilación-defosforilación y degradación de proteínas, y la respuesta neuroinflamatoria (89). La exposición a Al tiene efecto a nivel estructural y en la expresión génica: induce cambios topológicos en el ADN; disminución de la expresión de neurofilamentos y tubulina, de la neprilisina y de factores neurotróficos implicados en la sinapsis de los eventos memorísticos (90-94); eleva la expresión de la proteína precursora amiloidea (95) y altera la expresión genes proinflamatorios, proapoptóticos, marcadores de estrés oxidativo y de β secretasas (96-98). Promueve la acumulación anormal de proteínas que causan degeneración neurofibrilar, y proteína tau y péptidos β amiloide en cultivos celulares y en animales de experimentación (99-103). Influye en la liberación de neurotransmisores a nivel de sus receptores y enzimático, fundamentalmente de glutamato y acetilcolina, lo cual afecta la neurotransmisión sináptica (104-106). Afecta el metabolismo energético neuronal a través de la inhibición y disminución de la actividad de enzimas claves de la glucólisis, la vía de las pentosas fosfato y del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, y genera disfunción mitocondrial y disminución de ATP (107-111). Además, causa alteración del sistema glial y muerte neuronal (112, 113). Estas alteraciones neurológicas se han relacionado con desórdenes en el aprendizaje y pérdida de la memoria. Se ha demostrado que el efecto desacoplador del aluminio inhibe la potenciación a largo plazo; afecta la adquisición y retención de conocimientos; entorpece la memoria espacial, de referencia y de trabajo; e influye en la actividad eléctrica del hipocampo (20, 114, 115).

El modelo de déficit cognitivo inducido por Al permite estudiar el efecto de fármacos de una amplia variedad de actividades farmacológicas, en vista del amplio número de daños neuropatológicos en los cuales está involucrado, algunos de los cuales se han correlacionado con rasgos conductuales. Además, la administración crónica es fundamental para la instauración de los diferentes desórdenes lo cual se asemeja más al desarrollo de los diferentes tipos de demencia en los humanos. Aparte de la enorme evidencia de los estudios que se han realizado en humanos expuestos a la administración crónica de Al, este modelo se ha reproducido en ratas, ratones, monos y conejos; siendo las ratas probablemente las más empleadas (89). Predomina la administración por las vías periféricas, fundamentalmente la oral (intragástrica y en el agua de beber), aunque también se ha evaluado tras la administración intracerebral (20, 102). El rango de dosis varía en función de la especie animal empleada, la vía de administración, y según los daños neurológicos que se deseen verificar. Para la administración de Al por vía oral, en ratas, se reportan valores que oscilan entre 0.1 y 500 mg/kg de peso, por períodos de exposición superiores a 1 mes (84, 116-119). Por la vía i.p generalmente no se sobrepasan los 100 mg/kg (20). La dosis y el tiempo de exposición generalmente se escogen en

función de las alteraciones cerebrales que se desean estudiar, dado que no todas aparecen al mismo tiempo sino más bien como un desarrollo paulatino. En varios estudios se ha podido asociar cambios bioquímicos con efectos conductuales de déficit cognitivo pero no con alteraciones estructurales, las cuales requieren mayor tiempo de exposición para poder verificarse mediante las técnicas disponibles. De forma general, el efecto de la exposición crónica de Al a animales de experimentación, permite identificar cambios conductuales concretos que se asocian con déficit cognitivo y demencia, mediante el empleo de pruebas conductuales clásicas. Provoca dificultad en la adquisición y recuperación de la memoria espacial, la memoria de trabajo y la memoria asociativa (20, 116-119).

Modelo de demencia inducido por β -amiloide

Otra importante alternativa para inducir cambios neurobioquímicos y conductuales característicos de la demencia es el modelo de administración i.c.v de diferentes variantes de péptidos β -amiloide ($A\beta$). Este modelo fundamentalmente reproduce uno de los aspectos patológicos principales de la enfermedad de Alzheimer, presente también en otros tipos de demencia. El $A\beta$ ($A\beta$ 1-40 y $A\beta$ 1-42) neurotóxico se sintetiza a partir de la proteína precursora de amiloide (APP, del inglés Amyloid Precursor Protein) a causa de eventos de procesamiento anormales mediados por la presenilina 1 y la γ secretasa (120, 121). Por lo que, una alteración en las vías de procesamiento de APP se ha asociado con un incremento en la producción de $A\beta$ y/o con agregación en forma de oligómeros y placas seniles extracelulares responsables de algunas de las alteraciones patogénicas y clínicas de la enfermedad (122, 123).

Numerosos estudios *in vitro* e *in vivo* indican que el $A\beta$ afecta un amplio rango de funciones que conducen inevitablemente a la muerte neuronal y al déficit cognitivo (124, 125). Se ha reportado que la infusión de $A\beta$ 1-40 en los ventrículos cerebrales de ratas provoca la disminución de la actividad de la AChT en la corteza cerebral e hipocampo (126), así como reducción de la liberación de acetilcolina en la corteza cerebral e hipocampo y de dopamina en el estriado (127). Se ha verificado activación de la microglia (128) y varios signos morfológicos de daño neuronal después de la infusión e inyección de $A\beta$ 1-40 en ratas (129, 130), así como que interactúa directamente con las mitocondrias induciendo disfunción mitocondrial y muerte celular (131). Además, ha sido ampliamente reportado el potencial efecto inductor de estrés oxidativo del $A\beta$ 1-40, principalmente en el hipocampo y en la corteza cerebral (132); eventos que ocasionan daño oxidativo a las diferentes macromoléculas celulares (133). Por otro lado el péptido $A\beta$ 1-42, que posee mayor capacidad fibrogénica (134), induce muerte neuronal en la región CA1 del hipocampo, activación de astrocitos y de la microglía, formación de nitrotirosina y expresión de la óxido nítrico sintasa inducible luego de su administración i.c.v en ratones (124). Se han reportado que las formas oligoméricas solubles de $A\beta$ 1-42 causan

disrupción de las funciones neuronales y de los mecanismos sinápticos involucrados en la memoria, incluso antes de aparecer algún signo de neurotoxicidad (135-137). De forma similar, A β 1–42 fue estrechamente relacionado con pérdida de diversos marcadores sinápticos y de la memoria, bloqueo de la potenciación a largo plazo y reversión de la depresión a largo plazo (138-140). Además se ha destacado la elevada susceptibilidad de la sinapsis glutamatérgica en modelos animales de déficit cognitivo inducidos por A β (18, 141), la respuesta neuroinflamatoria que se genera (142, 143), y las diversas alteraciones en la vasculatura cerebral y de la barrera hematoencefálica (144). Similares estudios con los péptidos A β 1–40 y A β 1–42, se han realizado con el fragmento A β 25–35, el cual mantiene la habilidad de formar agregados y se le atribuye importante poder neurotóxico *in vitro* e *in vivo* (145-147). En ensayos *in vitro*, A β 25–35 ha mostrado efecto citotóxico vía apoptosis, mediado por disfunción mitocondrial y generación de especies reactivas del oxígeno en células SH-SY5Y (125). En correspondencia con los cambios neurobiológicos generados por la administración central del péptido A β , en sus diferente variantes, se ha podido confirmar que se manifiesta un déficit significativo en el aprendizaje y la memoria (18, 129, 130). El A β dificulta el aprendizaje espacial, interfiere en los procesos de instauración de la potenciación a largo plazo y de plasticidad sináptica, así como en algunos de los procesos de formación de la memoria de trabajo y de referencia (18, 130, 132, 148). Todas estas evidencias del impacto de A β en el aprendizaje y la memoria se han confirmado por un amplio número de pruebas conductuales que evalúan memoria de referencia, de trabajo, de reconocimiento y asociativa (18, 130, 132, 148).

La administración i.c.v de A β se ha experimentado fundamentalmente en ratas y ratones, tanto de forma unilateral como bilateral (18, 124, 125, 130, 132, 148). Sin embargo, la mayor cantidad de ensayos realizados para esclarecer mecanismos moleculares involucrados en la patogénesis de la demencia así como en la evaluación de nuevos candidatos terapéuticos, emplean ratas como principal modelo animal y la administración bilateral. El rango de concentraciones del péptido en solución administrada varía entre los nM y μ M, en una o varias administraciones (18, 124, 125, 130, 132, 148). La dosis y frecuencias de administración parecen ser escogidas en función de la magnitud del daño y en el tiempo en que desea verificarse, aunque también se ha observado variabilidad según el tipo de péptido A β . Mayores dosis y/o cantidad de frecuencias diarias son más comúnmente empleadas cuando se realizan evaluaciones conductuales en un período de tiempo corto después de la cirugía o última administración (18). De forma similar ocurre cuando se emplea el péptido A β 25–35, que puede administrarse durante uno o varios días, y realizarse la evaluación de su efecto en la memoria pasado solo 5 días (18, 125). En contraste, la tendencia general cuando se usan A β 1-40 y A β 1-42, es a evaluar su efecto en el aprendizaje y la memoria al menos 2 semanas posteriores a la administración de péptido (130, 132). Aun cuando se ha podido identificar algunas particularidades de

cada una de las vías y forma de administración de los péptidos A β , existe gran incongruencia en la metodología empleada debida a la amplia cuantía de variables experimentales (especie y forma A β , concentración administrada, duración del tratamiento y sitio de administración).

Este modelo animal de demencia inducido por péptidos A β es uno de los más reportados para la evaluación de nuevos candidatos terapéuticos, principalmente para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer (14, 18). Actualmente constituye uno de los principales modelos alternativos al empleo de animales transgénicos que se fundamentan en la patología amiloidea. Una de sus ventajas más apreciadas, es que permite controlar que tipo de especie A β , soluble o insoluble, es la que origina la pérdida de la memoria, lo cual se dificulta en los modelos transgénicos que pueden presentar ambas formas al mismo tiempo. Por lo que este modelo se ha considerado una alternativa válida frente a los animales transgénicos para evaluar el efecto en el cerebro de diferentes especies de péptidos A β , incluso sin la formación de las placas seniles (18).

Otras consideraciones metodológicas

Aunque la demencia puede afectar diversas funciones en los humanos, es la alteración de la memoria la condición esencial para considerar su diagnóstico. La memoria es una función cerebral que clasifica, codifica, almacena y recupera una amplia diversidad de información relevante para el sujeto (149). Cuando se emplean animales como modelos de deterioros conductuales similares a los que padecen los humanos con demencia, la elección de pruebas conductuales y el manejo de los sujetos son elementos de considerable importancia. Existen diferentes tipos de pruebas conductuales, que se clasifican generalmente atendiendo al tipo de memoria que se emplea para la ejecución de la tarea que impone la prueba. Por lo que según el tipo de pruebas es posible evaluar diferentes tipos de memoria, las cuales se ven afectadas considerablemente en pacientes humanos que padecen demencia. La memoria espacial, de trabajo y de referencia, se emplea en la ejecución de tareas que requieren el almacenamiento de información sobre la localización espacial de objetos, estímulos y/o lugares tanto a corto plazo como a largo plazo (149). Entre las pruebas de memoria espacial más utilizadas se encuentran los diferentes tipos de laberinto: laberinto en T, Y, radial, de Barnes y el laberinto acuático de Morris (150), siendo esta última probablemente la prueba más empleada. El empleo de la memoria emocional – asociativa, predomina en tareas de evitación activa y pasiva, en las cuales se requiere la asociación entre diferentes clases de señales de alerta para evitar un estímulo aversivo (151). Al mismo tiempo, se suele evaluar la llamada memoria de trabajo u operativa, como parte de pruebas conductuales de memoria espacial, memoria emocional o memoria de reconocimiento (152, 153). Así, la selección de la prueba conductual puede hacerse en función de la capacidad cognoscitiva que se desea estudiar, de modo que puede verificarse afectación de un tipo de memoria en particular e incluso de alguno de sus procesos de formación en específico. Por otro

lado, se ha podido constatar que los diferentes tipos de memoria son más sensible a un tipo de daño que a otros, por lo hay pruebas conductuales recomendadas para la evaluación de alteración cognitivo según el modelo experimental. Otro factor a considerar es que el tipo de memoria afectada puede estar modulada por la progresión temporal del daño, de modo que es posible observar cómo a medida que se comprometen diferentes estructuras cerebrales y redes neuronales, se afecta específicamente un tipo de memoria y luego otra.

Tanto como elegir una prueba conductual apropiada, es importante el tratamiento a los sujetos experimentales. Es necesario garantizar las condiciones óptimas de alojamiento, alimentación y manejo por parte del personal científico-técnico. La razón más básica para justificar dichos cuidados, además de la bioética, es la elevada influencia que ejercen el estrés y la ansiedad sobre la conducta animal (150, 154). Debe considerarse que todo resultado experimental, relativo al aprendizaje y la memoria, se obtiene a partir de inferencias hechas según la conducta que manifiesta el animal de experimentación ante una tarea. Por lo que, el investigador debe fijar condiciones experimentales que permitan la menor influencia sobre la conducta animal normal, y en consecuencia, garantiza la reproducibilidad de sus resultados. Como consenso general, el trabajo con animales de experimentación para evaluaciones conductuales de memoria y aprendizaje, requiere: 1) contar con personal calificado para el manejo de animales de experimentación, 2) garantizar la alimentación y alojamientos óptimas para el animal, 3) realizar las pruebas conductuales en instalaciones con temperatura y luz controladas, así como aisladas de ruidos externos extraños al animal, 4) reforzar el manejo habitual del animal previo a su empleo en las pruebas conductuales con el fin de reducir el estrés y transmitir confianza, 5) cumplir rigurosamente con las fases de habituación necesarias en caso de ser requeridas (155, 156).

La demencia es un síndrome clínico caracterizado por un deterioro global de las funciones mentales relativas a aspectos de la cognición, las emociones y la ejecución de tareas habituales. El denominador común de todos los desórdenes demenciales es el deterioro de la memoria y las facultades cognoscitivas debido a la muerte neuronal. Aun así, son diversos los eventos neurobiológicos que caracterizan a la enfermedad y un único modelo experimental no es capaz de reproducir todas las alteraciones patológicas observadas en los humanos. Sin embargo, los modelos animales constituyen actualmente la principal herramienta para la evaluación de nuevas terapias con relevancia en aspectos clínicos conductuales. Los modelos descritos en este artículo reproducen algunos de los principales perjuicios que conducen potencialmente a la aparición de déficit cognitivo y demencia, imitando en un ambiente controlado lo que ocurre clínicamente en los humanos. De los modelos de demencia inducidos farmacológicamente por administración sistémica, es el modelo de escopolamina el que está implicado fundamentalmente en la afectación de la neurotransmisión

colinérgica, mientras que el modelo de aluminio genera una respuesta neuroinflamatoria importante que se complementa con otro amplio número de eventos deletéreos. Por otro lado, los modelos de administración central afectan más selectivamente las áreas cerebrales implicadas en la memoria y el aprendizaje. La administración de estreptozotocina i.c.v genera un estado de resistencia cerebral a la insulina que compromete el metabolismo energético del cerebro, y con ello, la mayoría de las funciones cerebrales cognoscitivas. Por su parte, el modelo de administración de péptidos A β de diferentes naturalezas, constituye un modelo clásico para el estudio del Alzheimer como la demencia de mayor prevalencia a nivel mundial. Estos modelos animales ofrecen ventajas importantes frente a los transgénicos, entre ellas que puede producirse el daño a partir de sujetos inicialmente sanos y en cualquier etapa de su vida, puede seguirse el curso de los cambios patológicos desde el mismo instante en que se ocasiona el daño si se cuenta con técnicas sensibles, puede controlarse qué área cerebral se afecta inicialmente, se puede respetar la hipótesis de que la demencia puede desencadenarse a partir de un evento concreto sin implicar predisposición genética, y junto a estas y otras razones, los moderados costos en comparación con los transgénicos. De forma general, la elección de un modelo adecuado es a criterio del investigador y en función de los objetivos que persigue. De ahí, que en ocasiones es más acertado elegir un modelo que manifieste inicialmente un tipo de afectación específica, o por el contrario, que reproduzca la mayor cantidad de signos biológicos y clínicos de la enfermedad.

Literatura citada

1. Navarrete E, Prospéro O, Hudson R, Guevara L. Enfermedades neurodegenerativas que cursan con demencia. *Gaceta Médica R México*. 2000;136 (6).
2. Llibre J. Aging and Dementia: Implications for Cuba's Research Community Public Health and Society. *MEDICC Review*. 2013;15(4).
3. Kaptan HI, BJ. S. Sinopsis de Psiquiatría. . In: Panamericana E, editor. 7a. ed1997.
4. Mena LR, RH. R. La enfermedad de Alzheimer: una revisión. . *Revista Biomédica*. 1993;4:205-17.
5. Caldwell G. Alzheimer Insights. *Communi Lim*. 1997;2.
6. Van Dam D, De Deyn PP. Animal models in the drug discovery pipeline for Alzheimer's disease. *Br J Pharmacol*. 2011;164(4):1285-300.
7. Serrano-Pozo A, Mielke ML, Muzitansky A, Gomez-Isla T, Growdon JH, Bacskai BJ, et al. Stable size distribution of amyloid plaques over the course of Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2012;71(8):694-701.
8. Chui HC, Victoroff JI, Margolin D, Jagust W, Shankle R, Katzman R. Criteria for the diagnosis of ischemic vascular dementia proposed by the State of California Alzheimer's Disease Diagnostic and Treatment Centers. *Neurology*. 1992;42(3 Pt 1):473-80.

9. Cummings JL. Toward a molecular neuropsychiatry of neurodegenerative diseases. *Ann Neurol.* 2003;54(2):147-54.
10. McKeith IG, Dickson DW, Lowe J, Emre M, O'Brien JT, Feldman H, et al. Diagnosis and management of dementia with Lewy bodies: third report of the DLB Consortium. *Neurology.* 2005;65(12):1863-72.
11. Quinn N. Parkinson's disease: clinical features. . *Baillieres Clin Neurol.* 1997;6:1-13.
12. Doty RL, Bromley SM, Stern MB. Olfactory Testing as an Aid in the Diagnosis of Parkinson's Disease: Development of Optimal Discrimination Criteria. *Neurodegeneration.* 1995;4(1):93-7.
13. Trojanowski JQ, Leo VM. Aggregation of neurofilament and alpha-synuclein proteins in Lewis bodies: implications for pathogenesis of Parkinson disease and Lewis body dementia. . *Arch Neurol.* 1998;55:151-2.
14. Saraceno C, Musardo S, Marcello E, Pelucchi S, Diluca M. Modelling Alzheimer's disease: from past to future. *Frontiers in Pharmacology.* 2013;4.
15. Do Carmo S, Cuello A. Modeling Alzheimer's disease in transgenic rats. *Molecular Neurodegeneration.* 2013;8(1):37.
16. Klinkenberg I, Blokland A. The validity of scopolamine as a pharmacological model for cognitive impairment: a review of animal behavioral studies. *Neurosci Biobehav Rev.* 2010;34(8):1307-50.
17. Salkovic-Petrisic M, Knezovic A, Hoyer S, Riederer P. What have we learned from the streptozotocin-induced animal model of sporadic Alzheimer's disease, about the therapeutic strategies in Alzheimer's research. *J Neural Transm.* 2013;120(1):233-52.
18. Tucci P, Mhillaj E, Morgese MG, Colaianna M, Zotti M, Schiavone S, et al. Memantine prevents memory consolidation failure induced by soluble beta amyloid in rats. *Front Behav Neurosci.* 2014;8:332.
19. Salkovic-Petrisic M, Hoyer S. Central insulin resistance as a trigger for sporadic Alzheimer-like pathology: an experimental approach. *J Neural Transm Suppl.* 2007(72):217-33.
20. Abdel-Aal RA, Assi AA, Kostandy BB. Rivastigmine reverses aluminum-induced behavioral changes in rats. *Eur J Pharmacol.* 2011;659(2-3):169-76.
21. Kordower JH, Gash DM. Animal models of age- and diseaserelated cognitive decline: Perspectives on the models and therapeutic strategies. . *Neurobiology of Aging.* 1988;9(685-689).
22. Flood JF, Cherkin A. Scopolamine effects on memory retention in mice: a model of dementia? *Behav Neural Biol.* 1986;45(2):169-84.
23. Drachman DA, Leavitt J. Human memory and the cholinergic system. A relationship to aging? *Arch Neurol.* 1974;30(2):113-21.

24. Elrod K, Buccafusco JJ. An evaluation of the mechanism of scopolamine-induced impairment in two passive avoidance protocols. *Pharmacol Biochem Behav.* 1988;29(1):15-21.
25. Rush DK. Scopolamine amnesia of passive avoidance: a deficit of information acquisition. *Behav Neural Biol.* 1988;50(3):255-74.
26. Yoo DY, Kim W, Yoo KY, Lee CH, Choi JH, Kang IJ, et al. Effects of *Nelumbo nucifera* rhizome extract on cell proliferation and neuroblast differentiation in the hippocampal dentate gyrus in a scopolamine-induced amnesia animal model. *Phytother Res.* 2011;25(6):809-15.
27. Konar A, Shah N, Singh R, Saxena N, Kaul SC, Wadhwa R, et al. Protective role of *Ashwagandha* leaf extract and its component withanone on scopolamine-induced changes in the brain and brain-derived cells. *PLoS One.* 2011;6(11):e27265.
28. Chen W, Cheng X, Chen J, Yi X, Nie D, Sun X, et al. *Lycium barbarum* polysaccharides prevent memory and neurogenesis impairments in scopolamine-treated rats. *PLoS One.* 2014;9(2):e88076.
29. Pandareesh MD, Anand T. Neuromodulatory propensity of *Bacopa monniera* against scopolamine-induced cytotoxicity in PC12 cells via down-regulation of AChE and up-regulation of BDNF and muscarinic-1 receptor expression. *Cell Mol Neurobiol.* 2013;33(7):875-84.
30. Kumar H, Kim BW, Song SY, Kim JS, Kim IS, Kwon YS, et al. Cognitive enhancing effects of alpha asarone in amnesic mice by influencing cholinergic and antioxidant defense mechanisms. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2012;76(8):1518-22.
31. Hancianu M, Cioanca O, Mihasan M, Hritcu L. Neuroprotective effects of inhaled lavender oil on scopolamine-induced dementia via anti-oxidative activities in rats. *Phytomedicine.* 2013;20(5):446-52.
32. Blin J, Piercey MF, Giuffra ME, Mouradian MM, Chase TN. Metabolic effects of scopolamine and physostigmine in human brain measured by positron emission tomography. *J Neurol Sci.* 1994;123(1-2):44-51.
33. Ray CA, Blin J, Chase TN, Piercey MF. Effects of cholinergic agonists on regional brain energy metabolism in the scopolamine-treated rat. *Neuropharmacology.* 1992;31(11):1193-9.
34. dos Reis EA, de Oliveira LS, Lamers ML, Netto CA, Wyse AT. Arginine administration inhibits hippocampal Na(+),K(+)-ATPase activity and impairs retention of an inhibitory avoidance task in rats. *Brain Res.* 2002;951(2):151-7.
35. Ferrer I. Altered mitochondria, energy metabolism, voltage-dependent anion channel, and lipid rafts converge to exhaust neurons in Alzheimer's disease. *J Bioenerg Biomembr.* 2009;41(5):425-31.

36. Hauptmann S, Scherping I, Droese S, Brandt U, Schulz KL, Jendrach M, et al. Mitochondrial dysfunction: an early event in Alzheimer pathology accumulates with age in AD transgenic mice. *Neurobiol Aging*. 2009;30(10):1574-86.
37. Jahanshahi M, Nickmahzar EG, Babakordi F. Effect of Gingko biloba extract on scopolamine-induced apoptosis in the hippocampus of rats. *Anat Sci Int*. 2013;88(4):217-22.
38. Hattori N, Kitagawa K, Higashida T, Yagyu K, Shimohama S, Wataya T, et al. CI-ATPase and Na⁺/K⁽⁺⁾-ATPase activities in Alzheimer's disease brains. *Neurosci Lett*. 1998;254(3):141-4.
39. Grisar T, Guillaume D, Delgado-Escueta AV. Contribution of Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase to focal epilepsy: a brief review. *Epilepsy Res*. 1992;12(2):141-9.
40. Zaidi A. Plasma membrane Ca-ATPases: Targets of oxidative stress in brain aging and neurodegeneration. *World J Biol Chem*. 2010;1(9):271-80.
41. Bartus RT, Dean RL, Pontecorvo MJ, Flicker C. The cholinergic hypothesis: a historical overview, current perspective, and future directions. *Ann N Y Acad Sci*. 1985;444:332-58.
42. Baratti CM, Introini IB, Huygens P. Possible interaction between central cholinergic muscarinic and opioid peptidergic systems during memory consolidation in mice. *Behav Neural Biol*. 1984;40(2):155-69.
43. Stone W, Cottrill K, Gold P. Glucose and epinephrine attenuation of scopolamine-induced increases in locomotor activity in mice. *Neuroscience Research Communications*. 1987;1:105-11.
44. Izquierdo I. Mechanism of action of scopolamine as an amnestic. *Trends Pharmacol Sci*. 1989;10(5):175-7.
45. Hughes RN, Desmond CS, Fisher LC. Room novelty, sex, scopolamine and their interactions as determinants of general activity and rearing, and light-dark preferences in rats. *Behav Processes*. 2004;67(2):173-81.
46. Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res*. 2001;50(6):537-46.
47. Blondel O, Portha B. Early appearance of in vivo insulin resistance in adult streptozotocin-injected rats. *Diabete Metab*. 1989;15(6):382-7.
48. Kadowaki T, Kasuga M, Akanuma Y, Ezaki O, Takaku F. Decreased autophosphorylation of the insulin receptor-kinase in streptozotocin-diabetic rats. *J Biol Chem*. 1984;259(22):14208-16.
49. Lester-Coll N, Rivera EJ, Soscia SJ, Doiron K, Wands JR, de la Monte SM. Intracerebral streptozotocin model of type 3 diabetes: relevance to sporadic Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2006;9(1):13-33.

50. Salkovic-Petrisic M, Tribl F, Schmidt M, Hoyer S, Riederer P. Alzheimer-like changes in protein kinase B and glycogen synthase kinase-3 in rat frontal cortex and hippocampus after damage to the insulin signalling pathway. *J Neurochem.* 2006;96(4):1005-15.
51. Grunblatt E, Salkovic-Petrisic M, Osmanovic J, Riederer P, Hoyer S. Brain insulin system dysfunction in streptozotocin intracerebroventricularly treated rats generates hyperphosphorylated tau protein. *J Neurochem.* 2007;101(3):757-70.
52. Agrawal R, Tyagi E, Shukla R, Nath C. A study of brain insulin receptors, AChE activity and oxidative stress in rat model of ICV STZ induced dementia. *Neuropharmacology.* 2009;56(4):779-87.
53. Hoyer S. Glucose metabolism and insulin receptor signal transduction in Alzheimer disease. *Eur J Pharmacol.* 2004;490(1-3):115-25.
54. Zhao W, Chen H, Xu H, Moore E, Meiri N, Quon MJ, et al. Brain insulin receptors and spatial memory. Correlated changes in gene expression, tyrosine phosphorylation, and signaling molecules in the hippocampus of water maze trained rats. *J Biol Chem.* 1999;274(49):34893-902.
55. Zhao W, Chen H, Quon MJ, Alkon DL. Insulin and the insulin receptor in experimental models of learning and memory. *Eur J Pharmacol.* 2004;490(1-3):71-81.
56. Apelt J, Mehlhorn G, Schliebs R. Insulin-sensitive GLUT4 glucose transporters are colocalized with GLUT3-expressing cells and demonstrate a chemically distinct neuron-specific localization in rat brain. *J Neurosci Res.* 1999;57(5):693-705.
57. McEwen BS, Reagan LP. Glucose transporter expression in the central nervous system: relationship to synaptic function. *Eur J Pharmacol.* 2004;490(1-3):13-24.
58. Blokland A, Jolles J. Spatial learning deficit and reduced hippocampal ChAT activity in rats after an ICV injection of streptozotocin. *Pharmacol Biochem Behav.* 1993;44(2):491-4.
59. Hellweg R. Trophic factors during normal brain aging and after functional damage. *J Neural Transm Suppl.* 1994;44:209-17.
60. Hellweg R, Nitsch R, Hock C, Jaksch M, Hoyer S. Nerve growth factor and choline acetyltransferase activity levels in the rat brain following experimental impairment of cerebral glucose and energy metabolism. *J Neurosci Res.* 1992;31(3):479-86.
61. Sharma M, Gupta YK. Effect of chronic treatment of melatonin on learning, memory and oxidative deficiencies induced by intracerebroventricular streptozotocin in rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 2001;70(2-3):325-31.

62. Sharma M, Gupta YK. Chronic treatment with trans resveratrol prevents intracerebroventricular streptozotocin induced cognitive impairment and oxidative stress in rats. *Life Sci.* 2002;71(21):2489-98.
63. Terwel D, Prickaerts J, Meng F, Jolles J. Brain enzyme activities after intracerebroventricular injection of streptozotocin in rats receiving acetyl-L-carnitine. *Eur J Pharmacol.* 1995;287(1):65-71.
64. Shonesy BC, Thiruchelvam K, Parameshwaran K, Rahman EA, Karuppagounder SS, Huggins KW, et al. Central insulin resistance and synaptic dysfunction in intracerebroventricular-streptozotocin injected rodents. *Neurobiol Aging.* 2012;33(2):430 e5-18.
65. Shoham S, Bejar C, Kovalev E, Weinstock M. Intracerebroventricular injection of streptozotocin causes neurotoxicity to myelin that contributes to spatial memory deficits in rats. *Exp Neurol.* 2003;184(2):1043-52.
66. Shoham S, Bejar C, Kovalev E, Schorer-Apelbaum D, Weinstock M. Ladostigil prevents gliosis, oxidative-nitrative stress and memory deficits induced by intracerebroventricular injection of streptozotocin in rats. *Neuropharmacology.* 2007;52(3):836-43.
67. Chu WZ, Qian CY. [Expressions of Abeta1-40, Abeta1-42, tau202, tau396 and tau404 after intracerebroventricular injection of streptozotocin in rats]. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao.* 2005;25(2):168-70, 73.
68. Lannert H, Hoyer S. Intracerebroventricular administration of streptozotocin causes long-term diminutions in learning and memory abilities and in cerebral energy metabolism in adult rats. *Behav Neurosci.* 1998;112(5):1199-208.
69. Weinstock M, Kirschbaum-Slager N, Lazarovici P, Bejar C, Youdim MB, Shoham S. Neuroprotective effects of novel cholinesterase inhibitors derived from rasagiline as potential anti-Alzheimer drugs. *Ann N Y Acad Sci.* 2001;939:148-61.
70. Blokland A, Jolles J. Behavioral and biochemical effects of an ICV injection of streptozotocin in old Lewis rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 1994;47(4):833-7.
71. Prickaerts J, De Vente J, Honig W, Steinbusch H, Ittersum MMV, Blokland A, et al. Nitric oxide synthase does not mediate neurotoxicity after an i.c.v. injection of streptozotocin in the rat. *J Neural Transm.* 2000;107(7):745-66.
72. Golub MS, Tarara RP. Morphometric studies of myelination in the spinal cord of mice exposed developmentally to aluminum. *Neurotoxicology.* 1999;20(6):953-9.
73. McLaughlin AI, Kazantzis G, King E, Teared, Porter RJ, Owen R. Pulmonary fibrosis and encephalopathy associated with the inhalation of aluminium dust. *Br J Ind Med.* 1962;19:253-63.

74. Strong MJ, Garruto RM, Joshi JG, Mundy WR, Shafer TJ. Can the mechanisms of aluminum neurotoxicity be integrated into a unified scheme? *J Toxicol Environ Health*. 1996;48(6):599-613.
75. Shaw CA, Petrik MS. Aluminum hydroxide injections lead to motor deficits and motor neuron degeneration. *J Inorg Biochem*. 2009;103(11):1555-62.
76. Petrik MS, Wong MC, Tabata RC, Garry RF, Shaw CA. Aluminum adjuvant linked to Gulf War illness induces motor neuron death in mice. *Neuromolecular Med*. 2007;9(1):83-100.
77. el-Sebae AH, Abdel-Ghany ME, Shalloway D, Abou Zeid MM, Blancato J, Saleh MA. Aluminum interaction with human brain tau protein phosphorylation by various kinases. *J Environ Sci Health B*. 1993;28(6):763-77.
78. Chong YH, Suh YH. Aggregation of amyloid precursor proteins by aluminum in vitro. *Brain Res*. 1995;670(1):137-41.
79. Uversky VN, Li J, Fink AL. Metal-triggered structural transformations, aggregation, and fibrillation of human alpha-synuclein. A possible molecular link between Parkinson's disease and heavy metal exposure. *J Biol Chem*. 2001;276(47):44284-96.
80. Khan A, Ashcroft AE, Korchazhkina OV, Exley C. Metal-mediated formation of fibrillar ABri amyloid. *J Inorg Biochem*. 2004;98(12):2006-10.
81. Ricchelli F, Fusi P, Tortora P, Valtorta M, Riva M, Tognon G, et al. Destabilization of non-pathological variants of ataxin-3 by metal ions results in aggregation/fibrillogenesis. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39(5):966-77.
82. Alleva E, Rankin J, Santucci D. Neurobehavioral alteration in rodents following developmental exposure to aluminum. *Toxicol Ind Health*. 1998;14(1-2):209-21.
83. Miu AC, Andreescu CE, Vasiu R, Olteanu AI. A behavioral and histological study of the effects of long-term exposure of adult rats to aluminum. *Int J Neurosci*. 2003;113(9):1197-211.
84. Wang B, Xing W, Zhao Y, Deng X. Effects of chronic aluminum exposure on memory through multiple signal transduction pathways. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2010;29(3):308-13.
85. Wisniewski HM, Sturman JA, Shek JW. Aluminum chloride induced neurofibrillary changes in the developing rabbit a chronic animal model. *Ann Neurol*. 1980;8(5):479-90.
86. Flaten TP. Aluminium as a risk factor in Alzheimer's disease, with emphasis on drinking water. *Brain Res Bull*. 2001;55(2):187-96.
87. Rob PM, Niederstadt C, Reusche E. Dementia in patients undergoing long-term dialysis: aetiology, differential diagnoses, epidemiology and management. *CNS Drugs*. 2001;15(9):691-9.
88. Roman FS, Truchet B, Marchetti E, Chaillan FA, Soumireu-Mourat B. Correlations between electrophysiological observations of synaptic plasticity modifications and behavioral performance in mammals. *Prog Neurobiol*. 1999;58(1):61-87.

89. Kawahara M, Kato-Negishi M. Link between Aluminum and the Pathogenesis of Alzheimer's Disease: The Integration of the Aluminum and Amyloid Cascade Hypotheses. *Int J Alzheimers Dis.* 2011;2011:276393.
90. Bharathi, Jagannatha Rao KS, Stein R. First evidence on induced topological changes in supercoiled DNA by an aluminium D-aspartate complex. *J Biol Inorg Chem.* 2003;8(8):823-30.
91. Latha KS, Anitha S, Rao KS, Viswamitra MA. Molecular understanding of aluminum-induced topological changes in (CCG)₁₂ triplet repeats: relevance to neurological disorders. *Biochim Biophys Acta.* 2002;1588(1):56-64.
92. Muma NA, Singer SM. Aluminum-induced neuropathology: transient changes in microtubule-associated proteins. *Neurotoxicol Teratol.* 1996;18(6):679-90.
93. Johnson VJ, Sharma RP. Aluminum disrupts the pro-inflammatory cytokine/neurotrophin balance in primary brain rotation-mediated aggregate cultures: possible role in neurodegeneration. *Neurotoxicology.* 2003;24(2):261-8.
94. Luo Y, Niu F, Sun Z, Cao W, Zhang X, Guan D, et al. Altered expression of Abeta metabolism-associated molecules from D-galactose/AlCl₃ induced mouse brain. *Mech Ageing Dev.* 2009;130(4):248-52.
95. Walton JR, Wang MX. APP expression, distribution and accumulation are altered by aluminum in a rodent model for Alzheimer's disease. *J Inorg Biochem.* 2009;103(11):1548-54.
96. Lukiw WJ, Percy ME, Kruck TP. Nanomolar aluminum induces pro-inflammatory and pro-apoptotic gene expression in human brain cells in primary culture. *J Inorg Biochem.* 2005;99(9):1895-8.
97. Garcia T, Esparza JL, Giralt M, Romeu M, Domingo JL, Gomez M. Protective role of melatonin on oxidative stress status and RNA expression in cerebral cortex and cerebellum of AbetaPP transgenic mice after chronic exposure to aluminum. *Biol Trace Elem Res.* 2010;135(1-3):220-32.
98. Castorina A, Tiralongo A, Giunta S, Carnazza ML, Scapagnini G, D'Agata V. Early effects of aluminum chloride on beta-secretase mRNA expression in a neuronal model of beta-amyloid toxicity. *Cell Biol Toxicol.* 2010;26(4):367-77.
99. Diaz-Nido J, Avila J. Aluminum induces the in vitro aggregation of bovine brain cytoskeletal proteins. *Neurosci Lett.* 1990;110(1-2):221-6.
100. Kawahara M, Kato M, Kuroda Y. Effects of aluminum on the neurotoxicity of primary cultured neurons and on the aggregation of beta-amyloid protein. *Brain Res Bull.* 2001;55(2):211-7.
101. Kawahara M, Muramoto K, Kobayashi K, Kuroda Y. Functional and morphological changes in cultured neurons of rat cerebral cortex induced by long-term application of aluminum. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992;189(3):1317-22.

102. Pratico D, Uryu K, Sung S, Tang S, Trojanowski JQ, Lee VM. Aluminum modulates brain amyloidosis through oxidative stress in APP transgenic mice. *FASEB J.* 2002;16(9):1138-40.
103. Savory J, Huang Y, Herman MM, Reyes MR, Wills MR. Tau immunoreactivity associated with aluminum maltolate-induced neurofibrillary degeneration in rabbits. *Brain Res.* 1995;669(2):325-9.
104. Provan SD, Yokel RA. Aluminum inhibits glutamate release from transverse rat hippocampal slices: role of G proteins, Ca channels and protein kinase C. *Neurotoxicology.* 1992;13(2):413-20.
105. Meiri H, Banin E, Roll M, Rousseau A. Toxic effects of aluminium on nerve cells and synaptic transmission. *Prog Neurobiol.* 1993;40(1):89-121.
106. Bielarczyk H, Tomaszewicz M, Szutowicz A. Effect of aluminum on acetyl-CoA and acetylcholine metabolism in nerve terminals. *J Neurochem.* 1998;70(3):1175-81.
107. Socorro JM, Olmo R, Teijon C, Blanco MD, Teijon JM. Analysis of aluminum-yeast hexokinase interaction: modifications on protein structure and functionality. *J Protein Chem.* 2000;19(3):199-208.
108. Cho SW, Joshi JG. Inactivation of bakers' yeast glucose-6-phosphate dehydrogenase by aluminum. *Biochemistry.* 1989;28(8):3613-8.
109. Kumar V, Bal A, Gill KD. Impairment of mitochondrial energy metabolism in different regions of rat brain following chronic exposure to aluminium. *Brain Res.* 2008;1232:94-103.
110. Lemire J, Mailloux R, Puiseux-Dao S, Appanna VD. Aluminum-induced defective mitochondrial metabolism perturbs cytoskeletal dynamics in human astrocytoma cells. *J Neurosci Res.* 2009;87(6):1474-83.
111. Mailloux RJ, Hamel R, Appanna VD. Aluminum toxicity elicits a dysfunctional TCA cycle and succinate accumulation in hepatocytes. *J Biochem Mol Toxicol.* 2006;20(4):198-208.
112. Ghribi O, Herman MM, Forbes MS, DeWitt DA, Savory J. GDNF protects against aluminum-induced apoptosis in rabbits by upregulating Bcl-2 and Bcl-XL and inhibiting mitochondrial Bax translocation. *Neurobiol Dis.* 2001;8(5):764-73.
113. Erazi H, Sansar W, Ahboucha S, Gamrani H. Aluminum affects glial system and behavior of rats. *C R Biol.* 2010;333(1):23-7.
114. Platt B, Carpenter DO, Busselberg D, Reymann KG, Riedel G. Aluminum impairs hippocampal long-term potentiation in rats in vitro and in vivo. *Exp Neurol.* 1995;134(1):73-86.
115. Sethi P, Jyoti A, Singh R, Hussain E, Sharma D. Aluminium-induced electrophysiological, biochemical and cognitive modifications in the hippocampus of aging rats. *Neurotoxicology.* 2008;29(6):1069-79.

116. Gong QH, Wu Q, Huang XN, Sun AS, Shi JS. Protective effects of Ginkgo biloba leaf extract on aluminum-induced brain dysfunction in rats. *Life Sci.* 2005;77(2):140-8.
117. Shuchang H, Qiao N, Piye N, Mingwei H, Xiaoshu S, Feng S, et al. Protective effects of gastrodia elata on aluminium-chloride-induced learning impairments and alterations of amino acid neurotransmitter release in adult rats. *Restor Neurol Neurosci.* 2008;26(6):467-73.
118. Kumar A, Dogra S, Prakash A. Protective effect of curcumin (*Curcuma longa*), against aluminium toxicity: Possible behavioral and biochemical alterations in rats. *Behav Brain Res.* 2009;205(2):384-90.
119. Ribes D, Colomina MT, Vicens P, Domingo JL. Impaired spatial learning and unaltered neurogenesis in a transgenic model of Alzheimer's disease after oral aluminum exposure. *Curr Alzheimer Res.* 2010;7(5):401-8.
120. Goate A. Segregation of a missense mutation in the amyloid beta-protein precursor gene with familial Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2006;9(3 Suppl):341-7.
121. Shen C, Chen Y, Liu H, Zhang K, Zhang T, Lin A, et al. Hydrogen peroxide promotes A β production through JNK-dependent activation of gamma-secretase. *J Biol Chem.* 2008;283(25):17721-30.
122. Citron M. Strategies for disease modification in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci.* 2004;5(9):677-85.
123. Selkoe DJ. Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science.* 2002;298(5594):789-91.
124. Lee HE, Kim DH, Park SJ, Kim JM, Lee YW, Jung JM, et al. Neuroprotective effect of sinapic acid in a mouse model of amyloid beta(1-42) protein-induced Alzheimer's disease. *Pharmacol Biochem Behav.* 2012;103(2):260-6.
125. Jang JH, Kim CY, Lim SH, Yang CH, Song KS, Han HS, et al. Neuroprotective effects of *Triticum aestivum* L. against beta-amyloid-induced cell death and memory impairments. *Phytother Res.* 2010;24(1):76-84.
126. Nitta A, Itoh A, Hasegawa T, Nabeshima T. beta-Amyloid protein-induced Alzheimer's disease animal model. *Neurosci Lett.* 1994;170(1):63-6.
127. Itoh A, Nitta A, Nadai M, Nishimura K, Hirose M, Hasegawa T, et al. Dysfunction of cholinergic and dopaminergic neuronal systems in beta-amyloid protein--infused rats. *J Neurochem.* 1996;66(3):1113-7.
128. Nitta A, Fukuta T, Hasegawa T, Nabeshima T. Continuous infusion of beta-amyloid protein into the rat cerebral ventricle induces learning impairment and neuronal and morphological degeneration. *Jpn J Pharmacol.* 1997;73(1):51-7.

129. Hidalgo JJ, Cacabelos R. Beta-amyloid(1-40)-induced neurodegeneration in the rat hippocampal neurons of the CA1 subfield. *Acta Neuropathol.* 1998;95(5):455-65.
130. Bagheri M, Joghataei MT, Mohseni S, Roghani M. Genistein ameliorates learning and memory deficits in amyloid beta(1-40) rat model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Learn Mem.* 2011;95(3):270-6.
131. Reddy PH. Amyloid precursor protein-mediated free radicals and oxidative damage: implications for the development and progression of Alzheimer's disease. *J Neurochem.* 2006;96(1):1-13.
132. Haque AM, Hashimoto M, Katakura M, Hara Y, Shido O. Green tea catechins prevent cognitive deficits caused by Abeta1-40 in rats. *J Nutr Biochem.* 2008;19(9):619-26.
133. Markesbery WR. Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med.* 1997;23(1):134-47.
134. Yin YI, Bassit B, Zhu L, Yang X, Wang C, Li YM. {gamma}-Secretase Substrate Concentration Modulates the Abeta42/Abeta40 Ratio: IMPLICATIONS FOR ALZHEIMER DISEASE. *J Biol Chem.* 2007;282(32):23639-44.
135. Haass C, Selkoe DJ. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8(2):101-12.
136. Lesne S, Koh MT, Kotilinek L, Kaye R, Glabe CG, Yang A, et al. A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory. *Nature.* 2006;440(7082):352-7.
137. Shankar GM, Li S, Mehta TH, Garcia-Munoz A, Shepardson NE, Smith I, et al. Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat Med.* 2008;14(8):837-42.
138. Canas PM, Porciuncula LO, Cunha GM, Silva CG, Machado NJ, Oliveira JM, et al. Adenosine A2A receptor blockade prevents synaptotoxicity and memory dysfunction caused by beta-amyloid peptides via p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *J Neurosci.* 2009;29(47):14741-51.
139. Wilcox KC, Lacor PN, Pitt J, Klein WL. Abeta oligomer-induced synapse degeneration in Alzheimer's disease. *Cell Mol Neurobiol.* 2011;31(6):939-48.
140. Lambert MP, Barlow AK, Chromy BA, Edwards C, Freed R, Liosatos M, et al. Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(11):6448-53.
141. Canas PM, Simoes AP, Rodrigues RJ, Cunha RA. Predominant loss of glutamatergic terminal markers in a beta-amyloid peptide model of Alzheimer's disease. *Neuropharmacology.* 2014;76 Pt A:51-6.

142. De Felice FG, Velasco PT, Lambert MP, Viola K, Fernandez SJ, Ferreira ST, et al. Abeta oligomers induce neuronal oxidative stress through an N-methyl-D-aspartate receptor-dependent mechanism that is blocked by the Alzheimer drug memantine. *J Biol Chem.* 2007;282(15):11590-601.
143. McLarnon JG, Ryu JK. Relevance of abeta1-42 intrahippocampal injection as an animal model of inflamed Alzheimer's disease brain. *Curr Alzheimer Res.* 2008;5(5):475-80.
144. Jantaratnotai N, Ryu JK, Schwab C, McGeer PL, McLarnon JG. Comparison of Vascular Perturbations in an Abeta-Injected Animal Model and in AD Brain. *Int J Alzheimers Dis.* 2011;2011:918280.
145. Maurice T, Lockhart BP, Privat A. Amnesia induced in mice by centrally administered beta-amyloid peptides involves cholinergic dysfunction. *Brain Res.* 1996;706(2):181-93.
146. Perez-Severiano F, Salvatierra-Sanchez R, Rodriguez-Perez M, Cuevas-Martinez EY, Guevara J, Limon D, et al. S-Allylcysteine prevents amyloid-beta peptide-induced oxidative stress in rat hippocampus and ameliorates learning deficits. *Eur J Pharmacol.* 2004;489(3):197-202.
147. Pike CJ, Walencewicz-Wasserman AJ, Kosmoski J, Cribbs DH, Glabe CG, Cotman CW. Structure-activity analyses of beta-amyloid peptides: contributions of the beta 25-35 region to aggregation and neurotoxicity. *J Neurochem.* 1995;64(1):253-65.
148. Zhi WH, Zeng YY, Lu ZH, Qu WJ, Chen WX, Chen L. Simvastatin exerts anti-amnesic effect in Abeta25-35 -injected mice. *CNS Neurosci Ther.* 2014;20(3):218-26.
149. Carrillo PM, Giordano M, santamaría A. Spatial memory: Theoretical basis and comparative review on experimental methods in rodents. *Behav Brain Res.* 2009;203(2):151-64.
150. Sharma S, Rakoczy S, Brown-Borg H. Assessment of spatial memory in mice. *Life Sci.* 2010;87(17-18):521-36.
151. Maren S. Neurobiology of Pavlovian fear conditioning. *Annu Rev Neurosci.* 2001;24:897-931.
152. Ennaceur A. One-trial object recognition in rats and mice: methodological and theoretical issues. *Behav Brain Res.* 2010;215(2):244-54.
153. Ennaceur A, Delacour J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behav Brain Res.* 1988;31(1):47-59.
154. Schwabe L, Wolf OT. Learning under stress impairs memory formation. *Neurobiol Learn Mem.* 2010;93(2):183-8.
155. Morton DB, Jennings M, Buckwell A, Ewbank R, Godfrey C, Holgate B, et al. Refining procedures for the administration of substances. Report of the BVA/WF/FRAME/RSPCA/UFPA Joint Working Group on Refinement. British Veterinary Association Animal Welfare Foundation/Fund

for the Replacement of Animals in Medical Experiments/Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animals/Universities Federation for Animal Welfare. Lab Anim. 2001;35(1):1-41.

156. Methods and Welfare Considerations in Behavioral Research with Animals: Report of a National Institutes of Health Workshop. Washington, DC: U.S.: 2002 Contract No.: 02-5083.