

IMPAIRMENTS IN REMOTE MEMORY STABILIZATION PRECEDE HIPPOCAMPAL SYNAPTIC AND COGNITIVE FAILURES IN 5XFAD ALZHEIMER MOUSE MODEL.

Presentado por: A. Sobrino_Pérez¹ y A. López Escobar¹
Ryoichi Kimura and Masuo Ohno²

¹ Carrera de Biomedicina. Universidad Francisco de Vitoria, Madrid.
² Center for Dementia Research, Nathan Kline Institute, New York University School of Medicine, 140 Old Orangeburg Road, Orangeburg, NY 10962, USA.

OBJETIVOS:

Demostrar que el uso de ratones transgénicos puede ser una vía para la comprensión y el estudio de los mecanismos moleculares y fisiopatológicos de la enfermedad del Alzheimer que conducen a déficits de memoria.

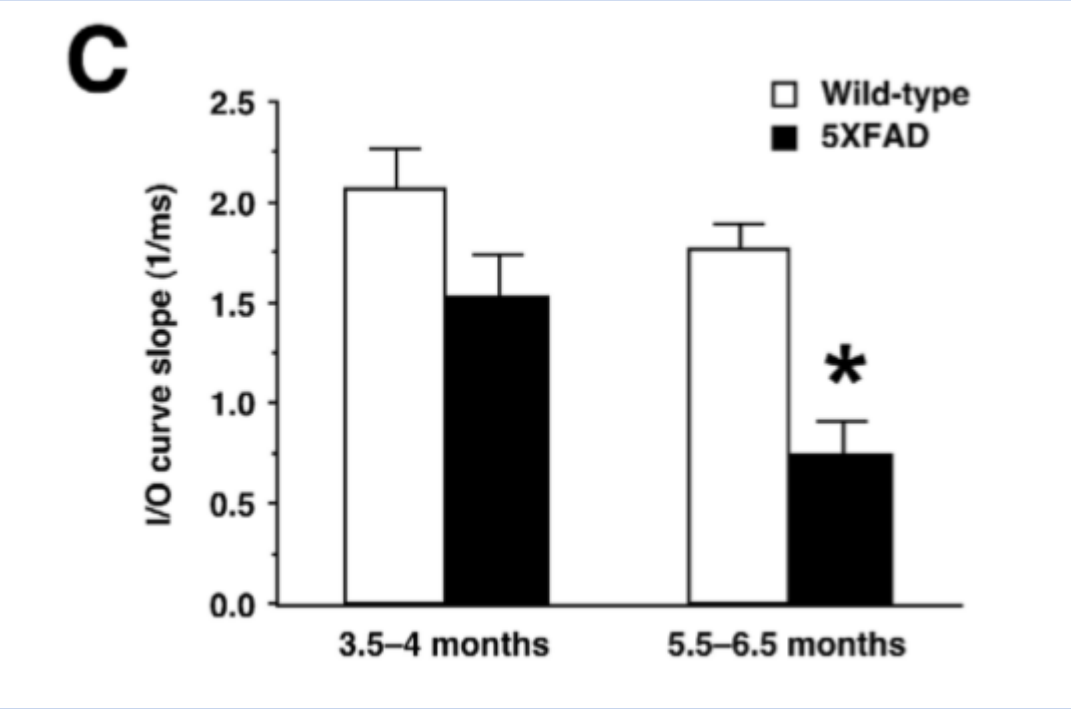
INTRODUCCIÓN:

Aunque hay modelos animales para la enfermedad de Alzheimer (AD) que representan la disfunción sináptica en el hipocampo y la disfunción cognitiva dependientes de β -amiloide, se tiene un pobre conocimiento de cómo la estabilización de la memoria dependiente de la corteza que sigue a la codificación en el hipocampo se ve afectada. Aquí, hemos analizado sistemáticamente fenotipos biofísicos y conductuales, incluyendo funciones de memoria remota, en ratones transgénicos 5XFAD APP/PS1 que contienen cinco mutaciones para AD familiar. Encontramos que los ratones 5XFAD presentan disfunción del hipocampo como observamos mediante los niveles reducidos de transmisión basal y potenciación a largo plazo en la sinapsis colateral-CA1 de Schaffer. La memoria dependiente de hipocampo testeada en el día 1 tras condicionamiento contextual del miedo también se ve alterada dependiendo de la edad en los ratones 5XFAD, en correlación con la aparición de los fallos sinápticos del hipocampo. Nuestros resultados indican que los ratones 5XFAD proporcionan un modelo animal útil para investigar los mecanismos e intervenciones terapéuticas para múltiples disfunciones sinápticas y de memoria asociadas a AD.

RESULTADOS:

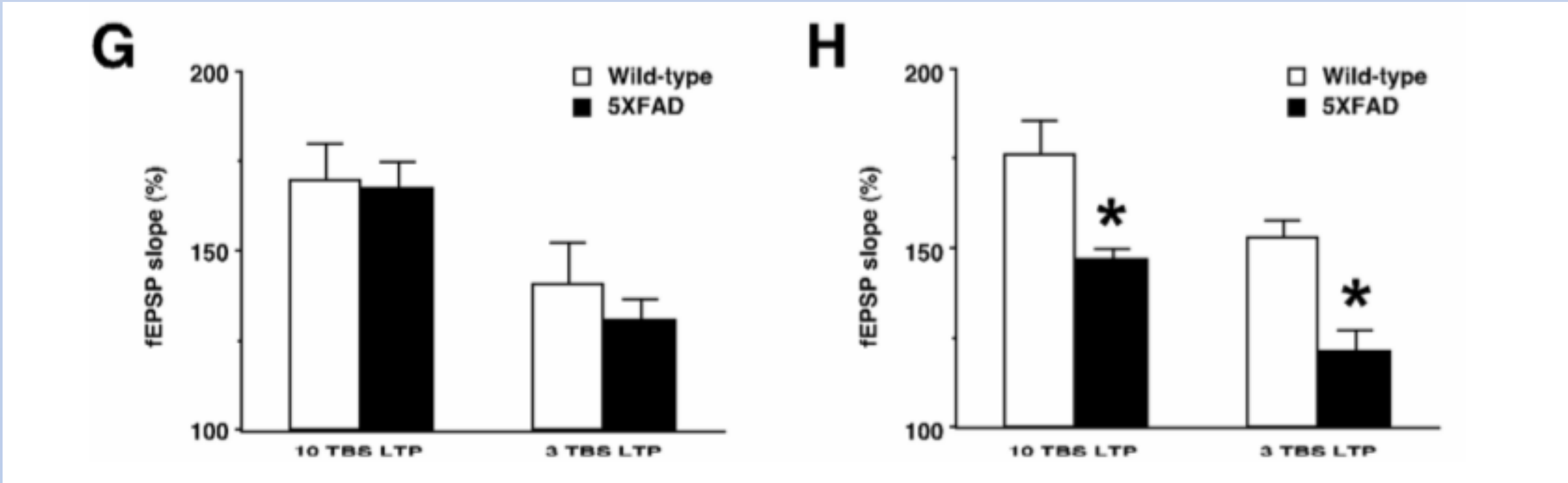
1. Fallos sinápticos del hipocampo en ratones 5XFAD:

Las consecuencias neurofisiológicas de la acumulación de A β que pueden ser la base de los déficits en la formación de la memoria del hipocampo son principalmente reducciones en la transmisión excitadora basal y / o LTP deficiente en las sinapsis glutamatérgicas CA1 del hipocampo en una serie de modelos de ratones transgénicos. Realizamos una evaluación sistemática de los cambios en las funciones sinápticas del hipocampo en ratones 5XFAD en diferentes etapas de progresión de la enfermedad.



Ratones 5XFAD. Figura C, el gráfico de barras de resumen muestra reducciones significativas en la transmisión sináptica basal medida por la pendiente promedio de las curvas de E / S en ratones 5XFAD a los 6 meses de edad pero no a <4 meses de edad (n = 9-11 ratones por grupo). * P <0.05 versus controles de wt. Todos los datos se presentan como media $\pm$ SEM.

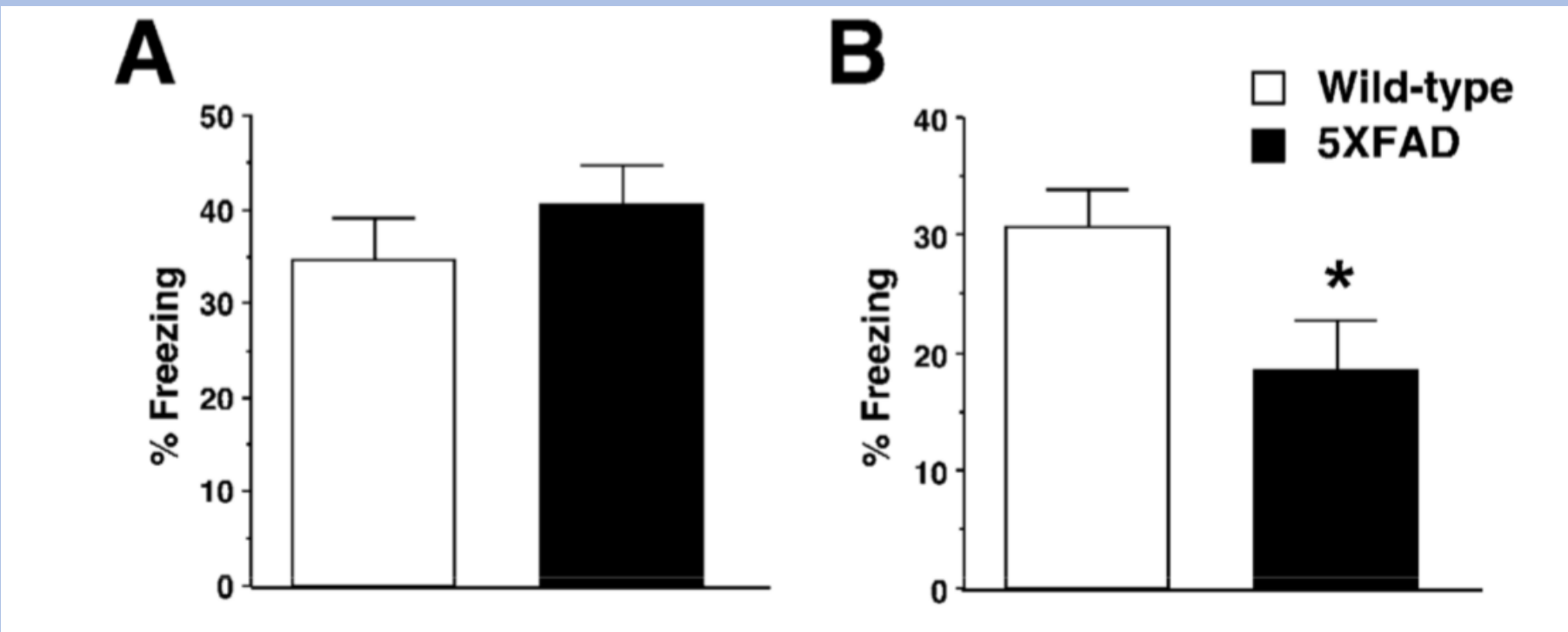
A continuación, se examina la plasticidad en las sinapsis colaterales CA1 del hipocampo de ratones 5XFAD.



Alteraciones de LTP dependientes de la edad, a diferencia de la potenciación por doble-pulso en cortes de hipocampo de ratones 5XFAD. G y H, los gráficos de barras de resumen muestran reducciones significativas en la LTP medida por las pendientes de fEPSP normalizadas promedio durante 30-40 minutos después de TBS en ratones 5XFAD a los 6 meses de edad (H) pero no a <4 meses de edad (G) (n = 5-8 ratones por grupo). * P <0.05 versus controles de wt. Todos los datos se presentan como media $\pm$ SEM.

2. Alteraciones de la formación de memoria en el hipocampo en ratones 5XFAD

Con el condicionamiento contextual del miedo, los ratones aprenden a asociar un estímulo exterior con un choque eléctrico aversivo en las patas. Los ratones wt exhiben una respuesta condicionada al miedo robusta medida mediante *freezing* al colocarlos en la cámara de 1 día después del condicionamiento. Mientras que los ratones 5XFAD <4 meses de edad presentan niveles de *freezing* indistinguibles de los wt, los ratones 5XFAD a los 6 meses de edad presentan niveles significativamente más bajos de *freezing* en comparación con los ratones wt. Por tanto, los ratones 5XFAD presentan déficits dependientes de la edad en la formación de la memoria del miedo contextual consistentes con la aparición de fallos sinápticos CA1 del hipocampo.



Deterioros dependientes de la edad del condicionamiento contextual por miedo en ratones 5XFAD. A y B, los ratones 5XFAD a <4 meses (A) o 6 meses (B) de edad y sus hermanos de camada wt fueron entrenados con un solo emparejamiento CS-US para el condicionamiento contextual del miedo. Los ratones 5XFAD a los 6 meses de edad muestran niveles significativamente más bajos de *freezing* contextual que los ratones wt cuando se prueban 1 día después del entrenamiento, pero no a <4 meses de edad (n = 13-30 ratones por grupo). * P <0.05 versus controles de wt. Todos los datos se presentan como media $\pm$ SEM

DISCUSIÓN:

Los ratones doble transgénicos 5XFAD APP/PS1 recogen muchas de los cambios patológicos relacionados con la enfermedad de Alzheimer de manera acelerada. Además de los niveles de Ab y la carga amiloide aumentan drásticamente en cerebros de %XFAD entre los 4 y 6 meses de edad, este estudio demuestra que las disfunciones sinápticas en hipocampo, cuantificadas por la reducción en transmisión basal y LTP en sinapsis colateral de Schaffer CA-1, surgen en ratones 5XFAD a los 6 meses de edad, pero no se encuentran antes de los 4 meses de edad. Los resultados son consistentes con las observaciones de que las corrientes dependientes de ambos NMDA y AMPA se ven disminuidas, y LTP dependiente de NMDA presenta alteraciones en la región CA1 del hipocampo de otros ratones transgénicos. Niveles sinápticos reducidos de algunas subunidades de estos dos receptores en neuronas de ratones APP dan una base molecular a estos cambios fisiológicos, aunque los mecanismos precisos por los cuales la acumulación de Ab altera la sinapsis queda por determinar. Concomitante con la aparición de fallos sinápticos en el hipocampo, ratones 5XFAD empiezan a presentar alteraciones en la formación de la memoria dependiente del hipocampo a partir de los 6 meses de edad. Por ello, es concebible que las reducciones de transmisión basal dependientes de A β , los déficits en LTP, o ambos, contribuyan al declive de la memoria. Este estudio revela que la estabilización de memorias remotas se ve también alterada en ratones 5XFAD de diferentes edades. Esta es la primera demostración de deficiencias en la estabilización de memorias remotas en modelos de ratón A β , que reflejan disfunción en la corteza probablemente debida a la acumulación significativa de A β en esta estructura cerebral. La aparición de déficits en la memoria remota precede a la aparición de disfunción cognitiva y sináptica en el hipocampo en ratones 5XFAD. Por tanto, es posible que estas memorias no puedan ser transferidas y estabilizadas como memorias remotas en la corteza cerebral, a pesar de que queden temporalmente codificadas en los circuitos del hipocampo durante fases tempranas de la progresión de AD. Los modelos transgénicos de AD han permitido grandes avances en el entendimiento tanto de la patogenia como de intervenciones terapéuticas para la enfermedad. En particular, el uso de estudios del comportamiento para estudiar los aspectos cognitivos es esencial para la evaluación de posibles estrategias terapéuticas. Recientemente se ha determinado que los transgénicos APP/PS1 también presentan alteraciones en las memorias no dependientes de hipocampo, consistente con las observaciones clínicas de AD. Asimismo, los resultados demuestran que la estabilización de memorias remotas cortical que sigue a la formación de la memoria en el hipocampo se ve alterada en modelos transgénicos 5XFAD APP/PS1. Por ello, se debe prestar más atención a estos procesos independientes del hipocampo en futuros experimentos para probar la eficacia de posibles terapias para el tratamiento de un amplio espectro de disfunciones cognitivas asociadas a la enfermedad de Alzheimer.

MATERIAL Y MÉTODOS:

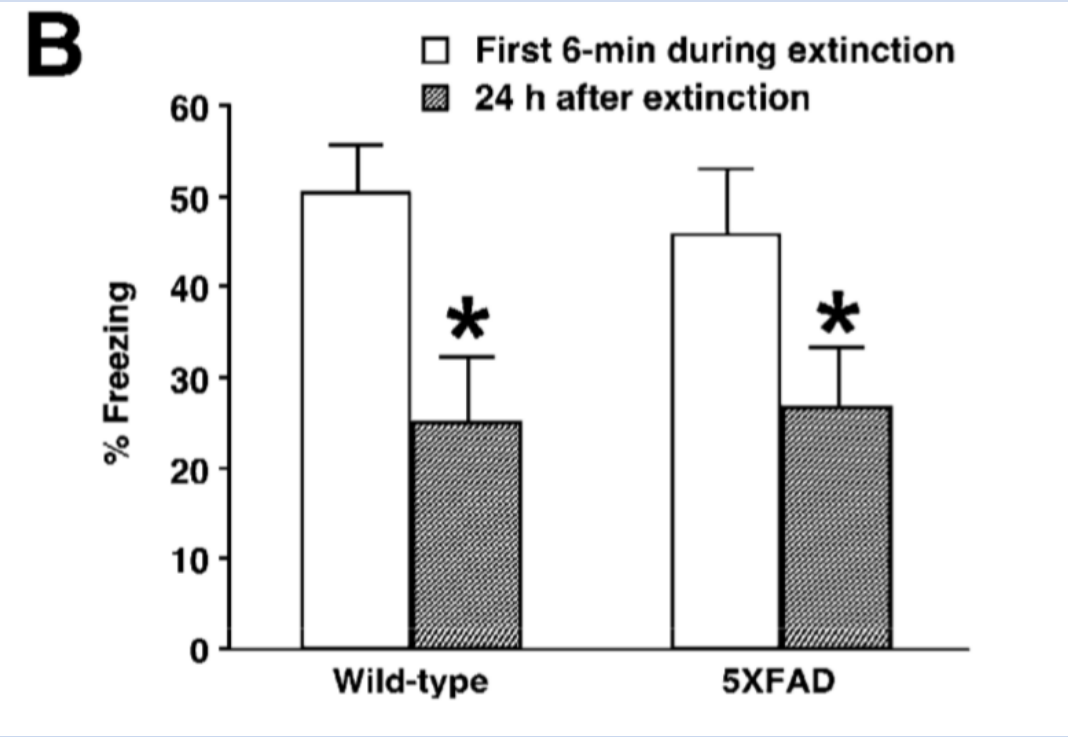
Líneas de ratones transgénicos: cinco mutaciones para FAD actúan conjuntamente para incrementar los niveles de péptidos b-amieloides, especialmente A β 42 neurotóxico. Se usan ratones no transgénicos wt para los controles. Los experimentos se realizaron entre los 4 y 6 meses de vida de los ratones, sin tener en cuenta el genotipo de los ratones.

Electrofisiología: evaluación de la transmisión sináptica basal mediante medidas de fEPSP (field excitatory postsynaptic potential) y TBS (10-theta-burst stimulation).

Condicionamiento contextual del miedo: FreezeFrame software para controlar choque eléctrico y analizar los datos. Respuesta al choque medida por comportamiento *freezing*, ausencia de todo movimiento a excepción del respiratorio. Videos con los datos analizados fotograma a fotograma para cuantificar el *freezing*.

Análisis estadístico: determinación de la diferencia de *freezing* entre los grupos mediante ANOVA unidireccional o ANOVA bidireccional junto con pruebas PLSD post-hoc de Fisher. Los datos se presentaron como media $\pm$ SEM y el nivel de significación se estableció para un valor de P menor que 0.05.

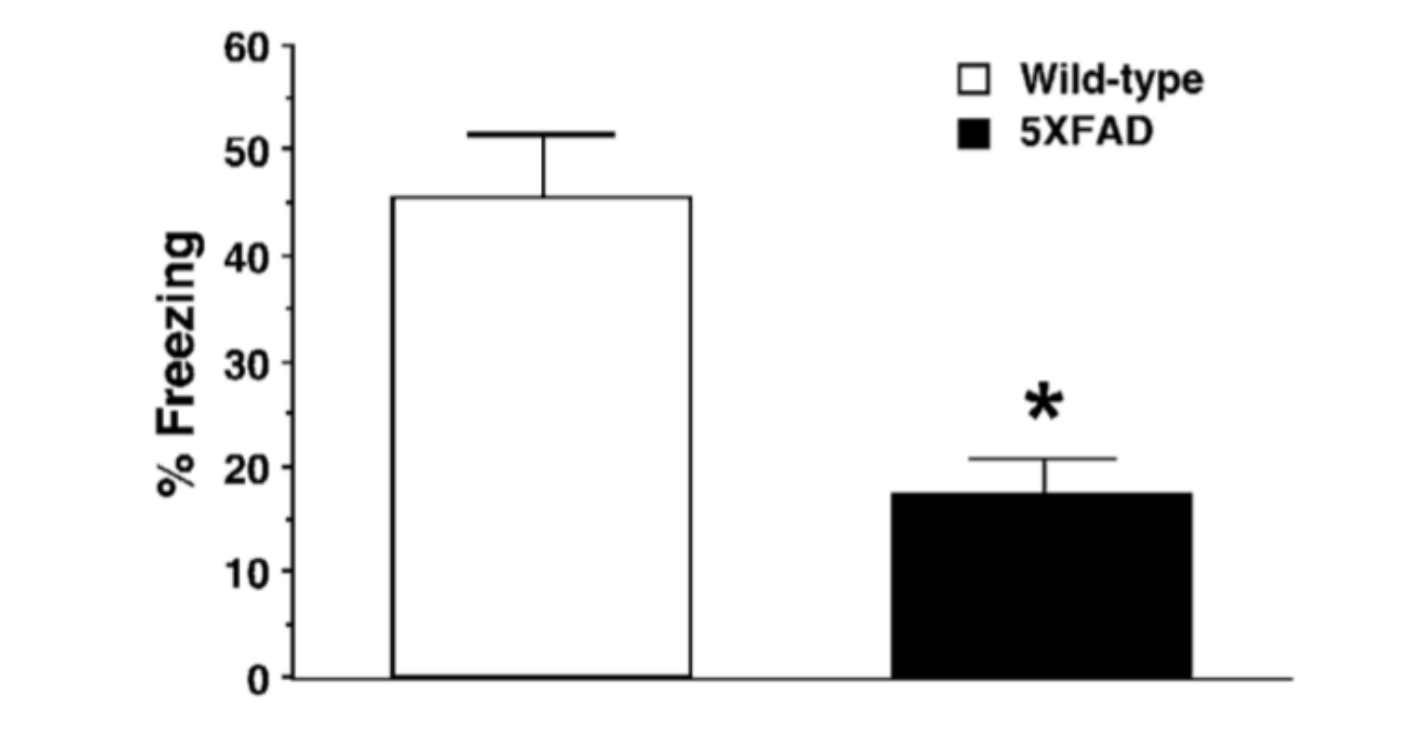
Para explorar aún más el procesamiento del hipocampo en el condicionamiento contextual del miedo en ratones 5XFAD, probamos la extinción de la memoria después de su adquisición.



Extinción normal de la memoria después del condicionamiento contextual del miedo en ratones 5XFAD a <4 meses de edad. Figura B, tanto los ratones wt como los 5XFAD muestran niveles significativamente más bajos de *freezing* durante la sesión de prueba administrada 1 día después de la reexposición de 30 minutos, en comparación con la primera sesión de extinción de 6 minutos (n = 7-9 ratones por grupo). * P <0.05 versus los primeros 6 min de extinción. Todos los datos se presentan como media $\pm$ SEM.

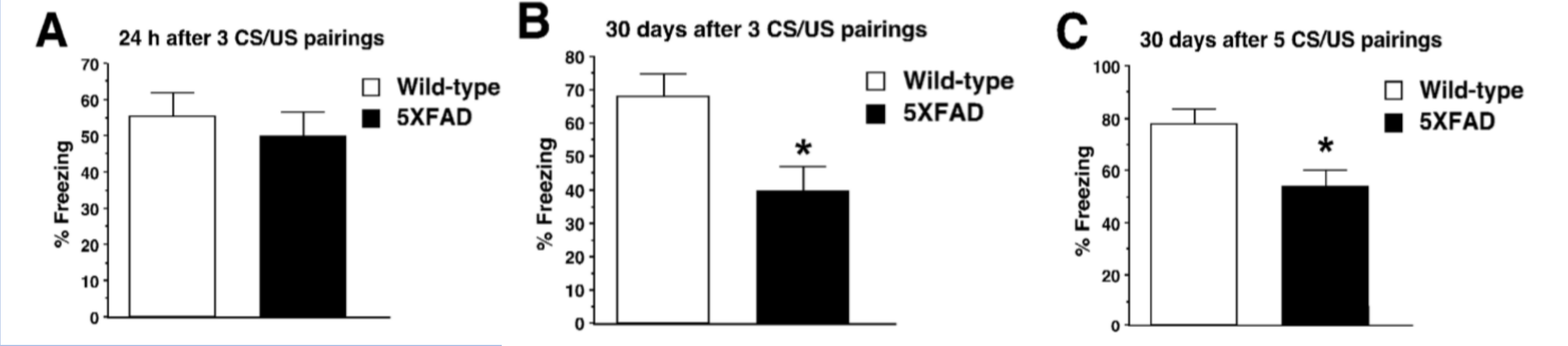
3. Alteraciones de la estabilización de memoria remota en ratones 5XFAD

Estudios previos con inactivación cerebral y técnicas de imagen demuestran el papel temporal del hipocampo en la formación y mantenimiento de la memoria, y proporcionan evidencia convergente para el cambio de tiempo de recuerdos recientes dependientes del hipocampo (1 día después del entrenamiento) a independiente del hipocampo (pero dependientes de la corteza) recuerdos remotos (~ 30 días después del entrenamiento) en una variedad de tareas de aprendizaje, incluido el condicionamiento contextual del miedo. Por lo tanto, probamos la función de memoria remota volviendo a exponer grupos separados de ratones a la cámara de entrenamiento 30 días después del condicionamiento de miedo contextual.



Deficiencias de la estabilización remota de la memoria después del condicionamiento por miedo contextual en ratones 5XFAD a <4 meses de edad. Los ratones 5XFAD y sus ratones de camada de wt fueron entrenados con un emparejamiento CS-US para el condicionamiento contextual del miedo. Los ratones 5XFAD muestran niveles significativamente más bajos de *freezing* contextual que los ratones de wt cuando se prueban 30 días después del entrenamiento (n = 8-15 ratones por grupo). * P <0.05 versus controles de wt. Todos los datos se presentan como media $\pm$ SEM.

Además, probamos si la función de memoria remota se mantuvo afectada en ratones 5XFAD de edad avanzada (6 meses de edad).



Deficiencias de la estabilización remota de la memoria después del condicionamiento por miedo contextual en ratones 5XFAD a los 6 meses de edad. A, los ratones 5XFAD muestran niveles de *freezing* contextual equivalentes a los de los ratones de wt cuando se prueban 1 día después del entrenamiento con tres parejas CS-US (n = 15-17 ratones por grupo). B, los ratones 5XFAD muestran niveles significativamente más bajos de *freezing* que los ratones de wt cuando se prueban 30 días después del entrenamiento con tres emparejamientos CS-US (n = 13 ratones por grupo). C, los ratones 5XFAD muestran niveles significativamente más bajos de *freezing* que los ratones de wt cuando se prueban 30 días después del entrenamiento con cinco parejas CS-US (n = 14 ratones por grupo). * P <0.05 versus controles de wt. Todos los datos se presentan como media $\pm$ SEM.