



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)**

**INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA**

**ESTREPTOZOTOCINA INTRACEREBROVENTRICULAR COMO MODELO  
ESPORÁDICO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER: IMPACTO EN LA MEMORIA  
ESPACIAL Y EN LOS RECEPTORES DE INSULINA EN EL HIPOCAMPO**

**T E S I S**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:**

**MAESTRA EN CIENCIAS**

**PRESENTA**

**MED. CYNTHIA GABRIELA ESTRADA GÓMEZ**

**TUTORA**

**DRA. SOFÍA YOLANDA DÍAZ MIRANDA**

**INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA**

**SANTIAGO DE QUERÉTARO, MAYO 2021**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

Universidad Nacional Autónoma de México

Instituto de Neurobiología

Los miembros del Jurado certificamos que la tesis elaborada por: Cyntia Gabriela Estrada Gómez, cuyo título es: “Estreptozotocina intracerebroventricular como modelo esporádico de la enfermedad de Alzheimer: Impacto en la memoria espacial y en los receptores de insulina en el hipocampo” se presenta como uno de los requisitos para obtener el grado de Maestría en Ciencias (Neurobiología) y cumple con los criterios de originalidad y calidad requeridos por la División de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

---

Dr. Roberto Agustín Prado Alcalá  
Presidente

---

Dra. Sofía Yolanda Díaz Miranda  
Secretaria (Tutora)

---

Dra. Claudia Pérez Cruz  
Vocal

---

Dr. Gilberto Aleph Prieto Moreno  
Suplente

---

Dr. Luis Oskar Soto Rojas  
Suplente

Aprobado por el Comité Académico

---

Coordinador del Programa

## RESUMEN

**Introducción:** La diabetes tipo 3 se refiere a una resistencia a la insulina confinada al cerebro, y se postula como una de las causas de la enfermedad de Alzheimer (EA). El modelo de neurodegeneración tipo EA esporádico por la administración de estreptozotocina (STZ) intracerebroventricular (icv) permite estudiar la resistencia a la insulina en la EA. Sin embargo, es un modelo poco caracterizado y los resultados no son concluyentes acerca de los mecanismos involucrados en el desarrollo de la EA.

**Objetivo:** Evaluar conductualmente e histológicamente la fase temprana del modelo de neurodegeneración tipo EA esporádico por la administración icv de STZ.

**Metodología:** Se utilizaron ratones macho de la cepa CD1 de 10 semanas de edad que fueron evaluados en grupos independientes a los 15 y a los 30 días posteriores a la STZ icv. Se midieron los niveles de glucosa en sangre, se evaluó la memoria de tipo espacial por medio del laberinto acuático de Morris (LAM) y, en el hipocampo dorsal de los mismos, se evaluó el nivel del receptor de insulina (RI) y del sustrato del receptor de insulina fosforilado (pSRI) en el residuo de serina 307. Por último, se valoró la presencia del péptido beta amiloide 1-42 en el hipocampo.

**Resultados:** No se registraron cambios en los niveles de glucosa sanguínea entre los grupos experimentales, pero sí hubo deterioro en el aprendizaje y la memoria espacial en el grupo evaluado 15 días después de STZ icv; no así en el grupo evaluado 30 días después de STZ, donde solo se observó una menor retención en la memoria espacial. A los 15 días post-STZ se encontró una disminución del RI en la región CA1 hipocampal, tanto en el *stratum oriens*, como en la capa piramidal. Cualitativamente no se observaron diferencias en el péptido beta amiloide ( $\beta$ A) al comparar los grupos de 15 y 30 días post-STZ icv.

**Conclusiones:** El modelo de neurodegeneración tipo EA esporádica inducido por STZ icv presenta deterioro transitorio de la memoria espacial. Nuestros datos sugieren que el fallo en la memoria espacial observado a los 15 días es independiente de los niveles sistémicos de glucosa, pero dependiente del RI.

## **ABSTRACT**

**Introduction:** Type 3 diabetes refers to insulin resistance confined to the brain and is postulated as one of the causes of Alzheimer's disease (AD). The sporadic AD type neurodegeneration model with intracerebroventricular (icv) injection of streptozotocin (STZ) allows the study of the insulin resistance-AD relationship, however, it is a poorly characterized model with inconclusive results of the mechanisms involved in the development of the pathology.

**Aim:** Evaluate at early times the sporadic AD type neurodegeneration model caused by icv administration of STZ.

**Methodology:** 10 weeks old CD1 male mice were used and evaluated in independent groups at 15 and 30 days after icv STZ. Blood glucose level was measured, spatial memory was evaluated by means of the Morris water maze and, by immunofluorescence, insulin receptor (IR) and phosphorylated insulin receptor substrate (pIRS) were evaluated in dorsal hippocampus. Finally, the presence of beta amyloid 1-42 peptide in hippocampus was assessed.

**Results:** There were no changes in blood glucose levels between groups, but there was an impairment in spatial learning and memory in the STZ group at 15-days; this was not the case for the 30 day group which showed spatial learning but not retention. Also, in the icv STZ 15-day group, reduced levels of IR were found in the CA1 hippocampus, in both the *stratum oriens* and the pyramidal layer. The beta amyloid peptide was detected at 15 and 30 days after icv administration of STZ.

**Conclusions:** The sporadic AD type neurodegeneration model caused by icv-STZ shows a transitory impairment of spatial memory. Our data suggested that the memory impairment observed at the earliest time evaluated (15 days) is glucose-independent, but IR-dependent.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la **Universidad Nacional Autónoma de México**, por ser mi casa de estudios, por darme educación y cultura, por ampliar mi visión de la diversidad humana.

Al **Instituto de Neurobiología**, por aceptarme en este programa, gracias a todos los investigadores que me brindaron clases, que me enseñaron su visión y el estado del arte de las neurociencias.

A la **Dra. Sofía Yolanda Díaz Miranda**, gracias por aceptarme y hacerme parte de su laboratorio, por darme la oportunidad de desarrollar mi proyecto y por el apoyo para asistir a congresos.

A la **Dra. Paola Cristina Bello Medina**, gracias por su asesoría y supervisión académica durante todo el proyecto, desde el planteamiento del problema, la estandarización de técnicas y el análisis de los resultados, así como supervisión para la presentación en diferentes congresos.

A mi comité tutor formado por el **Dr. Roberto Prado Alcalá** y la **Dra. Hilda Martínez Coria**, gracias por las orientaciones dadas para la culminación de este proyecto.

A la **M. en C Azucena Aguilar**, por el apoyo técnico otorgado en estos dos años.

A mi comité de sinodales formado por el **Dr. Roberto Prado Alcalá**, la **Dra. Sofía Yolanda Díaz Miranda**, la **Dra. Claudia Perez Cruz**, el **Dr. Aleph Prieto Moreno** y el **Dr. Luis Oskar Soto Rojas**, gracias por darme una nueva perspectiva sobre mi proyecto, por la revisión de la tesis y por plantearme nuevos retos académicos.

A las entidades de financiamiento:

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)** por brindarme la beca de maestría con número 927392.

Al **Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación**

**Tecnológica (PAPIIT)** por aprobar y contribuir al proyecto IN204519.

A las unidades de apoyo a la investigación del Instituto de Neurobiología:

Al **MVZ. José Martín García Servín** y a la **Dra. Alejandra Castilla León** del **Laboratorio Universitario del Bioterio** por la atención y orientación para el manejo de los animales, así como por su disponibilidad para dárme los.

A la **Dra. Deisy Gasca Martínez** de la **Unidad de Análisis Conductual**, por su accesibilidad durante la fase experimental del proyecto.

A la **Ing. Elsa Nydia Hernández Ríos** de la **Unidad de Microscopia**, por su apoyo en la enseñanza y utilización del microscopio confocal.

A las unidades de apoyo académico del Instituto de Neurobiología:

A la **Unidad de Enseñanza de Posgrado** de la Maestría en Neurociencias, por ayudar con los trámites administrativos y a la resolución de dudas.

Al **Dr. Francisco J. Valles Valenzuela** de la **Biblioteca del Campus Juriquilla**.

Al **Ing. Ramon Martínez Olvera** de la **Unidad de Cómputo**, por el apoyo otorgado cuando mi computadora dejó de funcionar.

A la **Lic. Ma. De Lourdes Lara Ayala (Q.E.P.D)** de la **Unidad de Videoconferencia** por el apoyo recibido para la programación de tutorales.

A la **Fundación Telmex** por el apoyo otorgado en estos años, así como por su invitación a los eventos de México SXXI.

A Dios en todas sus advocaciones, por mostrarme el mejor camino. Perseverancia, coraje, paciencia y amor como instrumentos necesarios en la vida.

A mi madre, Rosa Elis, por todo su apoyo durante toda mi vida, por su paciencia, consejos, amor y sabiduría, porque hablar contigo siempre me tranquiliza, gracias por ser mi roca en tiempos de flaqueza y por ser la persona a quien acudo en momentos de alegría.

A mi padre, Víctor Manuel, por todo su apoyo y comprensión en este tiempo, gracias por dejarme caminar por el sendero que elegí para mí.

A mi hermana, Mayra Lissete, por dejarme vivir contigo durante el posgrado, por la comprensión y paciencia, por alimentarme y enseñarme a manejar, por apoyarme a desplegar mis alas para ser independiente.

A mi hermana, Ana Georgina, por ser mi entrenadora favorita, porque sé que estás en la distancia.

A mis tías: Josefa, Dora, Gloria y tío Ulises, gracias por su confianza y por estar siempre pendiente de mí en la distancia, por su apoyo económico y moral.

A mis mascotas, Bondy y Ruffo por ser seres extraordinarios dadores de amor y alegría.

A mis abuelas, Catalina y Teresa, así como a mis abuelos, Urbano e Isaac, aunque ya no están entre nosotros sus enseñanzas trascienden generaciones, éstas han ayudado a formarme y a ver la vida con perspectiva.

A todos los artistas, poetas, pintores y escritores de los cuales me nutrí en estos últimos dos años y me enseñaron el sentido de la vida, gracias, el arte me salvó.

A Paola Bello, gracias por el tiempo invertido, por la paciencia y las pláticas.



A Martín, gracias por lo vivido y por la compañía. A Sergio Diego por involucrarme en la labor científica. A mis compañeros del laboratorio de Neuromorfología y del Desarrollo: Zyanya, Isaac, Israel, Yolanda, Jovana, Alexander, Jesús, Carlos, Don Sergio, Jorge y Erika, gracias por dejarme ver su visión sobre la investigación y por hacerme participe de la dinámica del laboratorio C-02.

A mi mejor amigo, Lalo, así como a mis hermanos de hospital, Giovanni y Lalo, gracias por escucharme y por darme consejos, por las risas y los recuerdos del hospital.

Finalmente, gracias al maravilloso equipo de expertos en salud mental que me han acompañado a lo largo del último año y que me han apoyado con mi crecimiento emocional.

## DEDICATORIA

*A mi mamá, esto es fruto de tu esfuerzo*

*A Pollita, expandimos nuestros límites y somos libres*

“Que grandes son las rutas alternas  
que me enseñan el camino a la libertad”

“Me preguntas tú también y yo te escucho;  
contesto que no te puedo contestar...tú mismo  
debes encontrar la respuesta”

*Walt Whitman*

## ABREVIATURAS

AMPA - Ácido-alfa-amino-3-hidroxil-5-metil-4-isoxazol-propionato  
APOE ɛ4: Apolipoproteína E  
CA – Cornu Ammonis  
CP - Células piramidales  
DOR - Densidad óptica relativa  
DT1 - Diabetes tipo 1  
DT2 - Diabetes tipo 2  
EA - Enfermedad de Alzheimer  
ECRI - Estado cerebral de resistencia a la insulina  
EDI - Enzima degradante de insulina  
GD - Giro dentado  
GD-LM - Giro dentado *stratum lacunosum molecular*  
GLUT-2 - Transportador de glucosa tipo 2  
GSK3 - Glucógeno sintasa cinasa 3  
ICV- Intracerebroventricular  
JNK - Quinasa c-Jun-N-terminal  
LAM - Laberinto acuático de Morris  
LCR artificial - Líquido cefalorraquídeo artificial  
MAP cinasas - Vía de las cinasas activadas por mitógenos  
NMDA - N-metil-D-aspartato  
PDK - Proteína cinasa B  
PET-FDG - Tomografía de emisión por positrones con fluorodesoxiglucosa  
PI3K - Fosfatidilinositol 3 quinasa  
PIP3 - Fosfatidilinositol-3, 4, 5- trifosfato  
PPA - Proteína Precursora Amiloidea  
pSer - Fosforilación del residuo de serina  
pSRI-1 (Ser 307) - Sustrato del receptor de insulina tipo 1 fosforilado en el residuo de serina 307  
RI - Receptor de insulina  
SRI - Sustrato del receptor de insulina  
STZ - Estreptozotocina  
TBS - Tris buffer salino  
TBS-T - Tris buffer salino tween  
TNF α - Factor de necrosis tumoral alfa  
VEH - Vehículo  
βA - Beta amiloide

## TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	I
ABSTRACT .....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
DEDICATORIA .....	VII
ABREVIATURAS.....	VIII
1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. ANTECEDENTES.....	2
2.1 Antecedentes históricos .....	2
2.2 Definiciones clínicas .....	3
2.3 Epidemiología.....	4
2.4 Clasificación de la EA.....	4
2.5 El hipocampo.....	6
2.6 Fisiopatología de la EA.....	8
2.6.1 La resistencia a la insulina como causa probable de la EA .....	11
3. VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE LA INSULINA .....	13
4. MODELOS ANIMALES DE LA EA .....	18
5. ESTREPTOZOTOCINA .....	19
6. JUSTIFICACIÓN .....	23
7. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN .....	23
8. HIPÓTESIS.....	24
9. OBJETIVO GENERAL .....	25
10. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
11. SUJETOS, MATERIAL Y MÉTODO.....	25
11.1 Sujetos .....	25
11.2 Cirugía estereotáxica .....	26
11.3 Laberinto Acuático de Morris (LAM).....	26
11.4 Eutanasia y obtención de muestras .....	29
11.5 Manejo de los tejidos.....	30
11.6 Inmunofluorescencia .....	30
11.7 Adquisición y análisis de imágenes.....	31
11.8 Análisis estadístico.....	33
12. RESULTADOS.....	33

12.1	La glucosa sanguínea no se altera por inyecciones icv de STZ.....	33
12.2	Efecto de la STZ sobre el aprendizaje espacial .....	34
12.2.1	La STZ imposibilita la curva de aprendizaje a los 15 días .....	34
12.2.2	La STZ no modifica el aprendizaje espacial a los 30 días .....	35
12.3	Efecto de la STZ sobre la memoria espacial.....	35
12.3.1	La STZ produce deterioro de la memoria espacial a los 15 días .....	35
12.3.2	La STZ produce deterioro de la memoria espacial a los 30 días .....	39
12.4	Efecto de la STZ sobre el péptido $\beta$ A.....	41
12.4.1	El péptido $\beta$ A está presente a los 15 y 30 días en el grupo STZ .....	41
12.5	Efecto de la STZ sobre el RI .....	42
12.5.1	La STZ disminuye los niveles del RI a los 15 días.....	42
12.5.2	La STZ no modifica los niveles del RI a los 30 días .....	44
12.6	Efecto de la STZ sobre el pSRI-1 (Ser307).....	46
12.6.1	La STZ no modifica los niveles del pSRI-1 (Ser307) a los 15 días.....	46
12.6.2	La STZ no modifica los niveles del pSRI-1 (Ser307) a los 30 días.....	48
13.	DISCUSIÓN .....	51
13.1	De la toxicidad de la STZ .....	52
13.2	De la glucosa sanguínea.....	53
13.3	Del aprendizaje espacial .....	54
13.4	De la memoria espacial.....	55
13.5	Del RI .....	57
13.6	Del péptido $\beta$ A.....	58
13.7	Del pSRI (Ser307) .....	60
13.8	Limitaciones y perspectivas .....	61
14.	CONCLUSIONES .....	62
15.	BIBLIOGRAFÍA .....	62
16.	ÍNDICE DE TABLAS .....	71
17.	ÍNDICE DE FIGURAS .....	72

## 1. INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la demencia más común a nivel mundial (Prince et al., 2015), de origen multifactorial y caracterizada por la progresión espacial y temporal de depósitos de placas del péptido beta amiloide ( $\beta$ A), así como de marañas neurofibrilares causadas por la agregación de la proteína tau (Selkoe y Hardy, 2016). Macroscópicamente en la EA se muestra una atrofia cerebral progresiva, bilateral y difusa que comienza en la región temporal (Scahill et al., 2002). Además, en pacientes con la EA se presenta un hipometabolismo cerebral de la glucosa (Mosconi et al., 2005; Mosconi et al., 2008). Esto se ha correlacionado con un estado cerebral de resistencia a la insulina (ECRI, Baker et al., 2011; Willette et al., 2015). Se ha demostrado el ECRI en cerebros *post-mortem* de pacientes con la EA (Stanley et al., 2016) que no presentaron diabetes tipo 2 ni hiperglucemia sistémica (Blázquez et al., 2014). El ECRI se caracteriza por una disminución en la señalización del receptor de insulina (RI) cerebral en respuesta a su activación por la insulina. En los últimos años, la investigación referente a la resistencia a la insulina en la EA ha cobrado importancia debido a que a la insulina a nivel hipocampal se le atribuyen funciones relacionadas con la memoria, plasticidad sináptica y potenciación a largo plazo, aparte de las metabólicas (Ferrario y Reagan, 2018; Grillo et al., 2015). Por lo que se sugiere a la ECRI como probable factor involucrado en la patogénesis de la EA; a esto se le ha denominado diabetes tipo 3 (Chen y Zhong, 2013; De Felice et al., 2014; De La Monte y Wands, 2008), la cual puede estar presente incluso 30 años antes de la aparición de la sintomatología en pacientes con factores de riesgo para la EA y progresar con el tiempo (Alexander et al., 2002; Braskie y Thompson, 2013). Se utilizan modelos animales que desarrollan la EA tipo esporádico dada la problemática que resulta estudiar el inicio preciso de estas alteraciones y el estudio de los mecanismos celulares implicados en cohortes longitudinales con seres humanos. Los modelos murinos permiten estudiar la relación resistencia a la insulina con la EA, porque se regula a la baja la vía de señalización de la insulina (Osmanovic Barilar et al., 2014), por ejemplo, mediante la inyección intracerebroventricular (icv) de estreptozotocina (STZ, Grieb, 2016). Acorde a (Knezovic et al., 2015) la administración icv de STZ promueve el depósito de placas  $\beta$ A y marañas neurofibrilares, además de generar deterioro en el aprendizaje

y la memoria espacial. Sin embargo, existen controversias respecto a los datos encontrados en este modelo porque la mayoría de los hallazgos son realizados en ratas con resultados no coincidentes entre autores referente al inicio del deterioro en la memoria espacial, la presencia del péptido  $\beta$ A y la regulación a la baja de la cascada de insulina en diferentes periodos de tiempo (15 y 30 días los periodos mas estudiados). Asimismo, son pocos los estudios que involucran ratones y, la información encontrada en este modelo sobre los mecanismos involucrados a nivel hipocampal que provocan el detrimento de la memoria no es concluyente. Por lo que para poder ser utilizado en la búsqueda de tratamientos contra la EA es importante abundar en su caracterización. El **objetivo** de este estudio es contribuir a la caracterización conductual e histologica del modelo de neurodegeneración tipo EA originado por la administración icv de STZ en en una fase temprana (15 y 30 días) en ratones macho CD1 de 10 semanas de edad. Teniendo en cuenta lo anterior, planteamos la **hipótesis** de que la administración icv de STZ inducirá deterioro en el aprendizaje y la memoria espacial a los 15 y 30 días posteriores, así como un decremento en el nivel del receptor de insulina (RI) y un aumento del nivel del sustrato del receptor de insulina tipo 1 fosforilado en el residuo de serina 307 (pSRI Ser307) en las regiones CA1 y CA3 del hipocampo dorsal y, al ser la STZ administrada vía icv no habrá alteraciones en la glucosa sistémica. Además, planteamos que se generará agregación del péptido  $\beta$ A 1-42 a nivel hipocampal.

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1 Antecedentes históricos**

A principios del siglo XX, se utilizaba de manera general la palabra “demencia” para designar a cualquier trastorno psiquiátrico. Fue hasta el año 1906 que Alois Alzheimer realizó la primera descripción de una demencia durante la 37° reunión de Psiquiatras del Sudoeste de Alemania en Tübingen (Hippius y Neundörfer, 2003), en la cual describió el caso clínico y anatomo-patológico de Auguste Deter, paciente del Hospital de Frankfurt desde el año 1901. Fue en esta reunión donde por primera vez se detallaron los síntomas cognitivos y no cognitivos de lo que en un futuro se denominaría la EA (López-álvarez et al., 2015), así como las placas del péptido  $\beta$ A y las marañas neurofibrilares características de esta patología. Pasaron años para que esta patología recibiera la importancia que

tiene hoy dentro de nuestra sociedad, al punto de considerarse actualmente como problema de salud pública y pandemia para el año 2050 (Executive Board, 2017).

## **2.2 Definiciones clínicas**

El concepto de demencia y EA ha cambiado a lo largo del tiempo. De las definiciones más aceptadas es la propuesta por la Clasificación Estadística Internacional de Enfermedades y Problemas Relacionados con la Salud (Organización Panamericana de la Salud, 1995) y el Manual Diagnóstico y Estadístico de Trastornos Mentales (American Psychiatric Association, 2013), quienes abordan a esta demencia desde un punto de vista clínico. Definen la EA como una “enfermedad cerebral de naturaleza crónica, con déficits de múltiples funciones superiores (memoria, pensamiento, orientación, comprensión, cálculo, capacidad de aprendizaje, lenguaje y juicio, entre otras) y conciencia clara”. En estas clasificaciones, el déficit se acompaña de deterioro del control emocional, del comportamiento social o de la motivación, produciendo deterioro intelectual apreciable que repercute en las actividades cotidianas (asearse, vestirse, comer o funciones excretoras) (López-álvarez et al., 2015). Sin embargo, el progreso en las neurociencias ha hecho viable la creación de nuevos criterios diagnósticos que abarquen datos clínicos y analíticos, con el fin de discernir entre la EA probable de otro tipo de demencia, ejemplo de ellos son los criterios del International Working Group (Dubois et al., 2014) y del National Institute of Aging-Alzheimer’s Association (Jack et al., 2018). Estos abordan la EA como “una afectación gradual y progresiva de la memoria episódica, aislada o asociada con otras alteraciones cognitivas, pero siempre demostrada por pruebas neuropsicológicas. A estos hallazgos clínicos han de sumarse la presencia de biomarcadores como: la atrofia en el lóbulo temporal medial evidenciada por resonancia magnética; la alteración de biomarcadores en líquido cefalorraquídeo, como la elevación de la proteína tau fosforilada y la disminución del péptido  $\beta$ A 1-42; el hipometabolismo cerebral evidenciado por tomografía de emisión por positrones con fluorodesoxiglucosa (PET-FDG) o, una mutación autosómica dominante” (López-álvarez et al., 2015).



## **2.3 Epidemiología**

La EA es la demencia más común y está asociada a una alta tasa de morbilidad y mortalidad. Su prevalencia aumenta de manera proporcional con el aumento de la esperanza de vida. Globalmente, se considera que existen 47 millones de personas con esta patología, proyectando más de 130 millones de afectados para el año 2050 (Prince et al., 2015). Anualmente, el número de casos se incrementa 7.7 millones, esto se traduce en un caso nuevo cada 4 segundos (Gutierrez et al., 2014). El mayor factor de riesgo para la EA es la edad (Prince et al., 2013). Acorde a Gaugler et al., (2016), a partir de los 65 años existe una mayor proporción de mujeres que desarrollan la EA comparado con los hombres, este aumento en la proporción de casos podría explicarse por las variaciones biológicas o genéticas, por la experiencia de vida (tareas ocupacionales y nivel educativo) o incluso se postula una asociación entre la APOE4 con los estrógenos, sin embargo la evidencia aun no es definitiva. Cabe destacar que los individuos no fallecen de la EA *per se*, sino que esta enfermedad en estadios avanzados incrementa la vulnerabilidad para otras enfermedades, siendo las infecciones la causa más común, lo cual ocasiona la muerte (Tinetti et al., 2012). En México se estima que en 2014 existían 860,000 personas con este padecimiento. La proyección del número de mexicanos afectados por una demencia para el año 2050 alcanzará la alarmante cifra de más de 3.5 millones, por lo que el impacto de esta enfermedad en los sistemas económico, social y de salud será severo (Gutierrez y García, 2017).

## **2.4 Clasificación de la EA**

Un bajo porcentaje de los casos de la EA (1%) son debidos a mutaciones genéticas para tres genes en específico. Estas mutaciones involucran al gen de la proteína precursora amiloidea (PPA, cromosoma 21), presenilina 1 (PSEN1, cromosoma 14) y, presenilina 2 (PSEN2, cromosoma 1). Los pacientes que presentan las primeras dos mutaciones tienen el 100% de probabilidad de desarrollar la enfermedad en el transcurso de su vida, mientras que los heredan la mutación de PSEN2, tienen 95% de probabilidades para desarrollar la EA. Los individuos con cualquiera de estas tres mutaciones tienden a desarrollar la patología antes de los 65 años, por lo que se denomina EA de inicio

temprano o variante familiar por ser una mutación que se presenta en varios miembros de una misma familia (Gaugler et al., 2016).

Con la excepción de los casos causados por mutaciones genéticas, para el resto de los casos de la EA se acepta que la enfermedad se desarrolla como resultado de múltiples causas, siendo en este caso denominada EA de inicio tardío (>65 años) o variante esporádica (99% de los casos) (Gaugler et al., 2016; Prince et al., 2013). En la variante esporádica de la EA, los principales factores de riesgo son: la edad, porque mientras la edad aumenta también lo hace la probabilidad de tener EA; una historia familiar de la EA en un familiar de primer grado, por la genética compartida o por un ambiente y estilo de vida similar o por una combinación de ambos; por último, es un factor de riesgo poseer la variante alélica 4 ( $\epsilon 4$ ) del gen de la apolipoproteína E (APOE). El gen de la APOE codifica para una proteína involucrada en el transporte del colesterol (Gaugler et al., 2016). Existen 3 variantes para su alelo, la APOE $\epsilon 2$ , la APOE $\epsilon 3$  y la APOE $\epsilon 4$ . La APOE $\epsilon 3$  es la más prevalente y la APOE $\epsilon 2$  es la menos prevalente en la población americana. Poseer un alelo  $\epsilon 4$  aumenta tres veces más el riesgo de desarrollar la EA y tener los dos alelos  $\epsilon 4$  incrementa de ocho a doce veces más el riesgo de desarrollar la EA comparado con el alelo  $\epsilon 3$ . A diferencia de las mutaciones en la EA en su forma familiar, el tener la mutación APOE $\epsilon 4$  no garantiza que un individuo desarrollará la EA (Keene et al., 2018).

La hipertensión, el tabaquismo, la obesidad, la dislipidemia y la diabetes se reconocen como factores de riesgo para la EA porque estas patologías cursan con alteraciones en los vasos sanguíneos que interfieren con el suministro sanguíneo fisiológico que se provee al cerebro propiciando hipometabolismo celular (Gaugler et al., 2016; Gottesman RF, 2017). Sin embargo, son susceptibles de modificación con el fin de reducir el riesgo de demencia (Prince et al., 2015).

Asimismo, existen factores que se consideran protectores para el evitar el desarrollo de la EA u otras demencias, como son: la actividad física, una dieta baja en grasas saturadas, un mayor nivel educativo y el permanecer social y mentalmente activo (Gaugler et al., 2016; Hamer M, 2009).

## 2.5 El hipocampo

Es una de las estructuras más estudiadas del cerebro, desde el reporte de caso del paciente H.M (Henry Molaison) en el año de 1957. El paciente H.M perdió la habilidad de formar nuevas memorias declarativas después de la remoción quirúrgica de una región temporal que involucró al hipocampo para tratar su epilepsia refractaria a tratamiento médico (Squire, 2009). El caso H.M fue un antecedente al descubrimiento de la potenciación a largo plazo en el hipocampo y su relación con la memoria de largo plazo, así como su relación con la EA.

En roedores, el hipocampo es una estructura longitudinal en forma de “C” o cuerno que se encuentra debajo de la neocorteza elevándose desde el piso de cada ventrículo lateral en la región cerebral temporal. Debido a su forma, el hipocampo debe su nombre al vocablo griego ἵππόκαμπος (ἵππος "caballo" + κάμπος "monstruo marino”).

La formación hipocampal se compone de tres estructuras: El hipocampo propiamente dicho, el giro dentado y el subiculum. A su vez, el hipocampo ha sido denominado “Cuerno de Amón” (CA) por el neuroanatomista Lorente de Nó, quien subdividió esta estructura en 4 áreas o campos: CA1, CA2, CA3 y CA4 (Figura 1). El hipocampo se caracteriza por su morfología trilaminar, donde una capa principal (células piramidales) se encuentra entre las otras dos capas con celularidad escasa. En la profundidad de la capa de células piramidales (CP) se encuentra el *stratum oriens* y, superficial a la CP se encuentra el *stratum radiatum* y el *stratum lacunosum-moleculare*. La región CA3 tiene una capa adicional, el *stratum lucidum*, el cual se encuentra superficial a la CP. A su vez, el giro dentado es una estructura trilaminar en forma de “V” que se subdivide en 3 capas: la capa granular, la capa polimórfica y la capa molecular (Burwell y Agster, 2008).

Las principales poblaciones neuronales que se encuentran en la formación hipocampal son: las células piramidales (hipocampo), las células granulares (giro dentado), las células musgosas (hilus) y diversas interneuronas GABAérgicas, axo-axonicas, en canasta, horizontales, trilaminar radiales, entre otras (Bello-Medina, 2011).

Un corte a lo largo del eje longitudinal hipocampal refleja el clásico “circuito trisináptico”, el cual establece que la corteza entorrinal provee la mayor aferencia al hipocampo a través de sus proyecciones axonales denominadas la vía perforante, la cual desemboca en la región del giro dentado, entonces el giro dentado proyecta a la región CA3 mediante las fibras musgosas, luego la región CA3 envía sus fibras a la región CA1 a través de las fibras colaterales de Schaffer y finalmente, la región CA1 proyecta de regreso a la corteza entorrinal completando el circuito (Figura 1). La creencia de unidireccionalidad de este circuito trisináptico postulaba al hipocampo como una estructura lamelar, organizada e independiente con diferentes módulos de procesamiento de información a lo largo de su eje longitudinal. Sin embargo, la anatomía moderna demuestra una amplia y compleja gama de conectividad a lo largo del eje longitudinal (o septo temporal), mostrando por cortes transversales que el hipocampo no es funcionalmente independiente, ya que tiene múltiples circuitos de procesamiento y retroalimentación (Knierim, 2015).

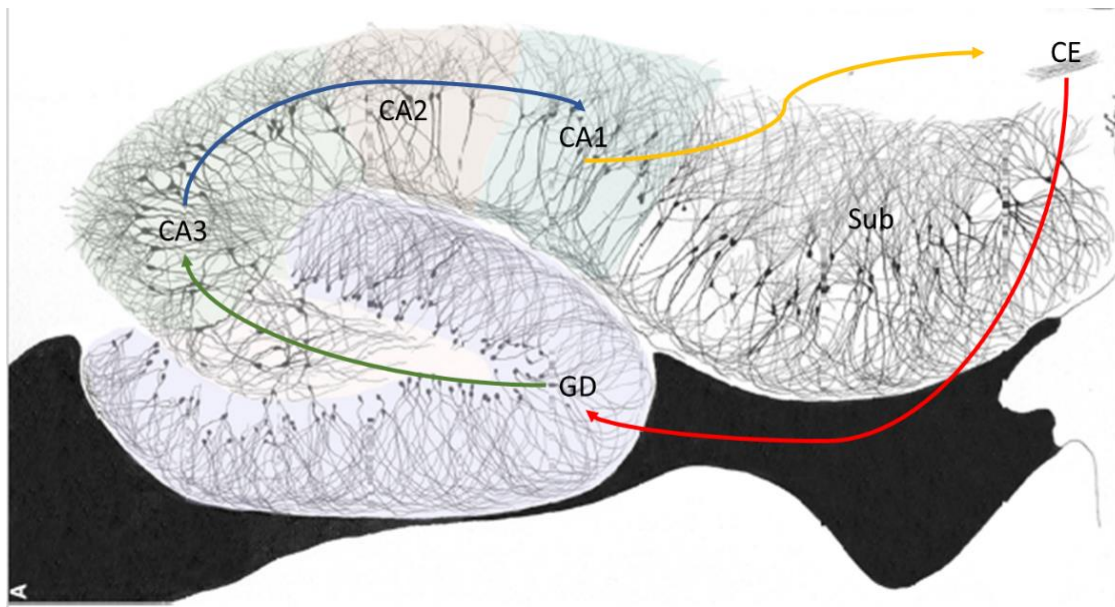


Figura 1. Dibujo con cámara lucida de un corte sagital del hipocampo dorsal con técnica de Golgi-Cox que esquematiza el clásico circuito trisináptico excitatorio hipocampal. Flecha roja: Vía perforante, flecha verde: fibras musgosas, flecha azul: colaterales de Schaffer, flecha amarilla: proyecciones de CA1 a la CE. CA: Cuerno de Amón, CE: Corteza entorrinal, GD: Giro dentado, Sub: Subiculum. Modificado de Larriva-Shad, 2014.

## 2.6 Fisiopatología de la EA

Si bien esta es una patología que en la mayoría de los casos es considerada heterogénea y de índole multifactorial, coincide a nivel histopatológico con la progresión espacial y temporal de depósitos de placas del péptido  $\beta$ A, así como de marañas neurofibrilares causadas por la agregación de la proteína tau (Figura 2). Esta enfermedad también se asocia con una disfunción sináptica, gliosis y muerte neuronal en regiones corticales, en el hipocampo, en el estriado ventral y en el cerebro anterior basal (Selkoe y Hardy, 2016). Macroscópicamente se observa una atrofia cerebral progresiva, bilateral y difusa (Figura 3) que comienza en la región temporal mesial para afectar después a las cortezas temporal, parietal y frontal (Scahill et al., 2002).

A partir de estudios genéticos, bioquímicos y en modelos animales, se ha sugerido que el péptido  $\beta$ A es el agente causal de la EA y que el resto de los cambios presentados son consecuencia de su aparición, a esto se le ha denominado la “hipótesis de la cascada amiloide” (Hardy y Higgins, 1992; Selkoe y Hardy, 2016). Se hipotetiza que la causa es la escisión incorrecta de este péptido a partir de la  $\beta$  y  $\gamma$  secretasas que cortan en fragmentos de 37-42 aminoácidos la PPA, por medio de la cual da inicio esta cascada amiloidogénica, siendo la isoforma 40 la de mayor concentración en las placas. Sin embargo, se le atribuye mayor toxicidad a la isoforma 42. No obstante, se ha mencionado un mayor daño por parte de los oligómeros del péptido  $\beta$ A, aunque se presenten en menor cantidad (Cline et al., 2018).

En las primeras descripciones histológicas realizadas por Braak y Braak en 1996, se reportó la progresión del depósito del péptido  $\beta$ A en 2,661 cerebros *post-mortem*. Comunicaron 3 estadios de desarrollo gradual del depósito cerebral del péptido de  $\beta$ A en pacientes con la EA. En estos estadios se observan depósitos de manera inicial en forma de parches en la neocorteza y en áreas poco mielinizadas como la región entorrinal y perirrinal (estadio A), cuando aumentan en número y se extienden en áreas neocorticales aledañas y en la formación hipocampal se reconoce como el estadio B y, si se distribuyen en todas las cortezas y en áreas mielinizadas se describe como el estadio C. Los estadios B y C aumentan en proporción directa conforme aumenta la edad.

De manera similar, Thal y cols, 2002 evidenciaron por histología la expansión progresiva del depósito del péptido  $\beta$ A en cerebros de pacientes con la EA comparados con pacientes sin demencia. Ellos describen 5 fases de depósito y progresión de la EA: en la fase 1 existen depósitos de  $\beta$ A en la neocorteza; en la fase 2, sumado a la fase 1 se muestran depósitos allocorticales; en la fase 3, sumado a la fase 2 hay depósitos en los núcleos diencefálicos y el núcleo estriado; en la fase 4, sumado a la fase 3 los depósitos se encuentran en distintos núcleos del tallo cerebral (sustancia nigra y zona reticular) y finalmente, en la fase 5, sumado a la fase 4 el péptido  $\beta$ A se encuentra en el cerebelo y tallo cerebral (núcleo pontino, *locus coeruleus*, núcleo central del rafe, núcleo retículo-tegmental, núcleo parabraquial). Posteriormente, correlacionaron estos datos con la aparición de signos y síntomas característicos de la enfermedad. Concluyen que la EA es una patología en la cual los estadios 1-3 se manifiestan antes de presentar datos clínicos de deterioro cognitivo.

Cabe añadir que la cantidad de las placas no se correlaciona con el desarrollo de la enfermedad. Se ha descrito la presencia del depósito del péptido  $\beta$ A años antes de la aparición del deterioro cognitivo y, se tiene una mejor correlación entre los agregados de la proteína tau fosforilada con el grado de severidad de la enfermedad. Esta información es congruente con el nuevo concepto de la EA preclínica (Dubois y Hampel, 2016; Mosconi et al., 2006). Sin embargo, a este péptido en condiciones fisiológicas se le atribuyen funciones reguladoras de la función sináptica, de transporte neuronal anterógrado y de exportador de hierro (Chen et al., 2017). Incluso se han encontrado depósitos de este péptido en forma de placas en cerebros de sujetos cognitivamente sanos (Sepulcre et al, 2018).

También, en la EA se presenta hipometabolismo cerebral de la glucosa que se observa por medio de PET-FDG en el hipocampo (Mosconi et al., 2005; Mosconi et al., 2008), en el giro del cíngulo, en el precúneo (zona media de la corteza parietal superior), en las cortezas frontal, occipital y en la temporoparietal (Langbaum et al., 2009), incluso se ha relacionado el hipometabolismo cerebral con el grado de severidad de la enfermedad (Alexander et al., 2002).

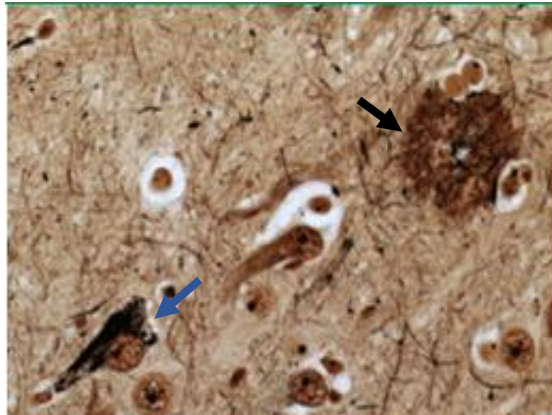


Figura 2. Fotomicrografía de cerebro humano con enfermedad de Alzheimer después de una tinción de Bielschowsky. En la región superior derecha se observa una placa extracelular (flecha negra) y en la región inferior izquierda, marañas neurofibrilares intracelulares (flecha azul). Tomada de Keene et al., (2018).

Price et al., (2001), estudiaron en los cerebros de 29 pacientes *post-mortem* {4 sin demencia, 4 con la EA asintomática (con datos anatomopatológicos de la EA pero sin deterioro cognitivo clínico), 8 pacientes con EA leve y, 4 pacientes con EA severa}. Evaluaron la pérdida neuronal en la corteza entorrinal y en el CA1 del hipocampo. Reportaron en los pacientes con la EA leve una disminución de la capa dos de la corteza entorrinal y del CA1 del hipocampo. Esta pérdida fue mayor en sujetos con la EA severa. Concluyen que las manifestaciones clínicas de la EA solo aparecen cuando existe una pérdida neuronal significativa en la densidad neuronal en estas regiones.

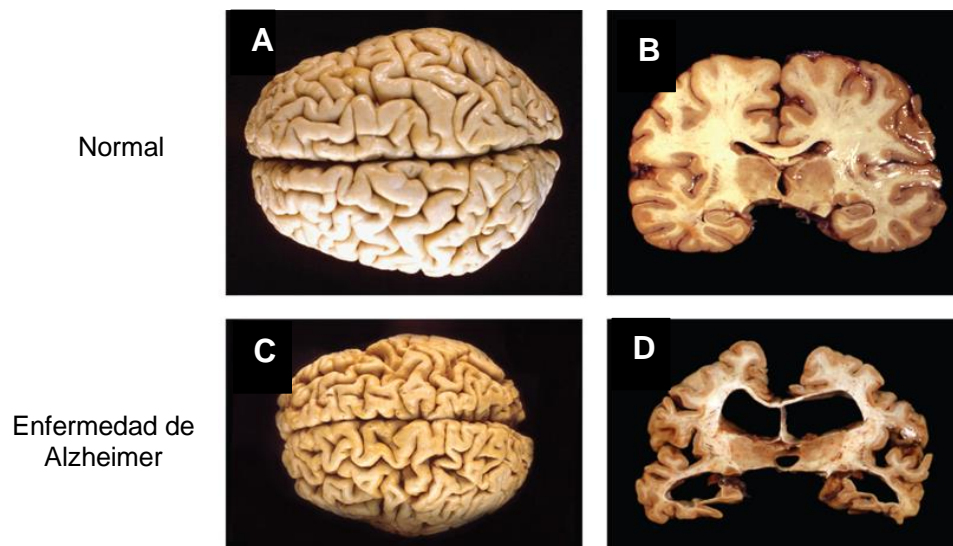


Figura 3. Imágenes macroscópicas de la atrofia cerebral observada en una persona sana y una persona con la enfermedad de Alzheimer. Persona con cognición íntegra (línea superior) A) Vista superior, B) Corte coronal. Persona con enfermedad de Alzheimer (línea inferior) C) Vista superior, D) Corte coronal. Tomado de Kandel y Schwartz, (2012).

Aunado a lo ya descrito, en años recientes se ha hecho énfasis en nuevos mecanismos involucrados en la fisiopatología de la EA. Ejemplo de ello son las alteraciones encontradas a nivel mitocondrial, de estrés oxidativo, de neuroinflamación y de resistencia a la insulina.

### **2.6.1 La resistencia a la insulina como causa probable de la EA**

La insulina es una hormona polipeptídica producida en los islotes de las células beta pancreáticas, la cual se secreta al torrente sanguíneo ante un aumento en los niveles plasmáticos de glucosa (Olivares Reyes et al., 2008). Por muchos años se asumió que la insulina solo presentaba funciones metabólicas periféricas y, se consideró al cerebro como un órgano insensible a la insulina. El postulado inicial donde se comprobó la importancia de la insulina a nivel cerebral fue a través de la regulación ejercida en el hipotálamo, descrita por Schwartz et al., 2000. Sin embargo, con el descubrimiento de la presencia de la insulina y su receptor en diversas regiones cerebrales como en la corteza y en el hipocampo, ha sido más claro y aceptado el papel de las diversas funciones de la insulina en el sistema nervioso central y su relación con la cognición, motivación, alimentación y metabolismo (Ferrario y Reagan, 2018).

A nivel cognitivo la insulina ejerce acciones en el hipocampo propiciando la plasticidad sináptica, el aprendizaje y la memoria a largo plazo (Grillo et al., 2015). El efecto de la insulina sobre el aprendizaje y la memoria ha sido demostrado en pacientes con diabetes tipo dos (DT2), quienes exhiben deficiencias en las funciones mentales superiores como la memoria y la atención comparados con sujetos sin la enfermedad (Cerezo Huerta, et al., 2013).

Ante la presencia de diversas alteraciones metabólicas sistémicas que pudieran tener influencia en el deterioro de la memoria en los modelos animales de DT2, y ante la falta de especificidad de estos modelos animales para modificar la vía de señalización de la insulina en una sola región cerebral, Grillo y colaboradores expusieron por medio de la inyección de lentivirus anti RI en el hipocampo de ratas Sprague Dawley de dos meses de edad una escasez de los RI a nivel hipocampal y que la ausencia de este receptor en el hipocampo produce deterioro en la memoria de largo plazo, no así en el aprendizaje ni



en la memoria a corto plazo. Los autores postulan que la activación de la cascada de la insulina facilita la plasticidad sináptica al promover el tráfico y la expresión a nivel membranal de receptores de glutamato tipo NMDA (N-metil-D-aspartato) y tipo AMPA (ácido-alfa-amino-3-hidroxil-5-metil-4-isoxazol-propionato), los cuales facilitan la entrada de calcio a nivel celular y la potenciación a largo plazo.

Por otra parte, evidencia reciente apoya el concepto del ECRI y del hipometabolismo cerebral como probables factores involucrados en la patogénesis de la EA (Chen y Zhong, 2013; De Felice y Lourenco, 2014; De la Monte y Wands, 2008) (Figura 4) porque ha sido diagnosticado en cerebros *post-mortem* de pacientes con la EA (Stanley et al., 2016). El ECRI se caracteriza por una disminución en la respuesta de la señalización de la insulina cerebral a partir del RI. El ECRI lleva a la neurodegeneración y deterioro cognitivo en los modelos animales de neurodegeneración tipo EA esporádica (Lester-coll et al., 2006).

Mientras que el ECRI puede ser detectado solo *post-mortem*, lo cual no aporta evidencia para conocer el inicio de esta alteración, los estudios de imagen por medio de PET-FDG han permitido la visualización *in vivo* a lo largo del tiempo de la disfunción del metabolismo cerebral de glucosa en pacientes con factores de riesgo para la EA o con la EA diagnosticada (Alexander et al., 2002; Braskie y Thompson, 2013). Willette et al., 2015, demostraron por medio de PET-FDG, en adultos mayores sanos con factores de riesgo para la EA, que existe una correlación inversa entre la resistencia a la insulina medida por el índice HOMA-IR y el metabolismo de glucosa cerebral a nivel del lóbulo temporal medial izquierdo. También, el grupo de Baker et al., 2011, ha demostrado por medio de PET-FDG, en pacientes prediabéticos o con DT2 sin la EA establecida, que la resistencia a la insulina puede ser un marcador de riesgo para la EA y que se encuentra asociada con una disminución del consumo de glucosa cerebral en regiones frontales, temporales, parietales y cinguladas. Esta disfunción en la glucosa cerebral también ha sido encontrada en las cortezas (temporo-parietal, frontal, entorrinal) y en el hipocampo (Mosconi et al., 2005).

El ECRI representa una desregulación metabólica confinada al cerebro, asociado con estrés oxidativo y neuroinflamación, el cual puede o no estar acompañado de

alteraciones en la homeostasis metabólica sistémica, ya que la DT2 es considerada un factor de riesgo para el desarrollo de la EA (Ott et al., 1999). Sin embargo, la DT2 y los cambios metabólicos sistémicos que esta genera no son causa necesaria para el desarrollo de la EA, ya que no todos los pacientes con DT2 desarrollarán la EA, ni todos los pacientes con la EA presentan DT2. Además, la EA no se ha asociado con hiperglucemia sistémica (Blázquez y Velázquez, 2014), por lo cual un modelo sistémico de DT2, aunque sea capaz de imitar las características de deterioro del aprendizaje y la memoria, todavía no es viable para ser usado como modelo de estudio de la EA. Si bien esta documentada la asociación epidemiológica entre la DT2 y la EA, los mecanismos que las relacionan aun no están del todo esclarecidos porque estudios que incluyen necropsias de pacientes con DT2 y deterioro cognitivo diagnostican como causante del deterioro cognitivo a la patología vascular cerebral (microinfartos e infartos lacunares) más que a los cambios clásicos de la EA (depósito del péptido BA y marañas neurofibrilares) (Abner et al., 2016; Arvanitakis et al., 2006). No obstante, el procesamiento de la insulina y el metabolismo de la glucosa cerebral esta alterado desde estadios preclínicos de la EA por lo cual puede haber un traslape entre los mecanismos celulares de la DT2 y la EA (Chornenky et al., 2019).

Por estos antecedentes se le ha denominado “diabetes tipo 3” a la EA porque la cantidad total de insulina cerebral no es suficiente para producir una respuesta normal en el cerebro y/o el RI no es capaz de responder ante la insulina (Figura 4). Además, en la EA las concentraciones del receptor de insulina se encuentran disminuidas (Liao et al., 2015).

### **3. VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE LA INSULINA**

De manera normal los RIs y los componentes de su vía de señalización están presentes de forma activa en varias áreas del cerebro incluyendo el hipocampo, en esta región su función principal radica en favorecer la plasticidad sináptica (Liao et al., 2015), sin dejar de lado sus funciones metabólicas. De forma general, la insulina se une a su receptor de superficie celular, el RI, el cual es un heterotetramero compuesto por dos subunidades  $\alpha$  y dos subunidades  $\beta$  unidas por puentes disulfuro que presenta actividad intrínseca de tirosina cinasa. La unión de la insulina con las subunidades  $\alpha$  del RI desencadena su

autofosforilación en las subunidades  $\beta$ , lo cual lleva a una serie de eventos de fosforilación/desfosforilación de diversas cinasas tipo serina/treonina y tirosina las cuales son encargadas de transmitir las cascadas de señalización para la regulación de eventos intracelulares (Olivares y Arellano, 2008). Dos vías principales de transducción son activadas por acción de la insulina: la vía de las cinasas activadas por mitógenos (MAP cinasas) la cual se relaciona con la expresión de genes, proliferación, diferenciación y crecimiento celular y, la vía del fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K) la cual se relaciona con la regulación de diversos procesos metabólicos incluyendo el transporte de glucosa, glucogénesis, adipogénesis y síntesis de proteínas (Gutiérrez-Rodelo et al., 2017, Figura 4).

Para la vía de las MAP cinasas, su cascada inicia posterior a la fosforilación de residuos de tirosina del RI, luego se promueve la asociación de la proteína Shc, la cual une al complejo Grb2/ SOS; SOS es un factor capaz de activar a Ras. La activación de Ras (GTP-Ras) inicia el encendido de la cascada de las MAP cinasas. GTP-Ras se une y activa a Raf-1 que subsecuentemente lleva a la fosforilación y activación de la vía, que involucra el reclutamiento y activación de MEK (cinasa de MAP cinasa) y de las ERK1 (cinasa regulada extracelularmente 1) y ERK2 (Olivares y Arellano, 2008, Figura 4).

Para la vía del PI3K, su señalización inicia una vez que el RI está activo y autofosforilado, el cual interacciona con el sustrato del receptor de insulina (SRI, 1 a 4 isoformas, Cheng et al., 2010) y los fosforila, estos se convierten en sitios de unión y activación de proteínas, muchas de las cuales funcionan como proteínas adaptadoras, como es el caso de PI3K. La interacción entre ambas proteínas provoca cambios alostéricos dando por resultado la activación de la subunidad catalítica de PI3K (Cheng et al., 2010). A consecuencia de ello, PI3K se localiza cerca de la membrana plasmática en donde tiene acceso a sus sustratos PI4-P (fosfatidilinositol 4-fosfato) y PI4,5-P2 (fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato), los cuales son fosforilados generando los productos PIP2 (PI3,4-bisfosfato) y PIP3 (PI3,4,5- trisfosfato). El PIP3 sirve como sitio de unión para cinasas como PDK1 (cinasa dependiente de fosfoinositidos-1), y Akt o proteína cinasa B (PKB). En el caso de la cinasa Akt, después de su reclutamiento a la membrana plasmática es fosforilada para que se active completamente. La enzima Akt regula varios

de los efectos metabólicos de la insulina a través de la fosforilación de diversos sustratos que propagan la respuesta de la insulina, incluyendo a la glucógeno sintasa cinasa 3 (GSK3), a la proteína de unión al elemento de respuesta al AMP cíclico (factor de transcripción CREB) y a la molécula blanco de la rapamicina en mamíferos (mTOR), entre otras (Olivares y Arellano, 2008, Figura 4).

Aunque la fosforilación de tirosina del SRI-1 genera la señal de insulina, SRI-1 es fosforilado en sus residuos de serina y treonina antes, durante y después de la estimulación a insulina (Copps y White, 2012). Hay estudios que se han centrado en los residuos de serina/treonina como un mecanismo general que modula la señalización de insulina (Copps y White, 2012). Estas investigaciones dan evidencia de un proceso altamente regulado que puede modular la sensibilidad a insulina o contribuir a su resistencia (Copps y White, 2012; Samuel y Shulman, 2012). Sin embargo, el conocimiento sobre los mecanismos de regulación de estos residuos continúa incompleto por el gran número de residuos de serina/treonina del SRI-1 encontrados. Se han identificado más de 50 residuos del SRI-1 pSerina/pTreonina de los cuales solo algunos han sido estudiados y se ha sugerido que el pSer307 es un blanco principal de la cinasa c-Jun N terminal (JNK), la cual parece impedir la interacción entre el RI activado y el SRI-1 (relación RI/SRI-1) (Hanc y Qiu, 2014). Así, el pSer307 ha sido investigado de manera amplia ya que ha sido asociado con la resistencia a la insulina bajo condiciones patológicas incluyendo la obesidad, la desregulación neuronal y la EA (Hançer et al., 2014; Hirosumi et al., 2002).

También se ha demostrado que los oligómeros de  $\beta$ A promueven la activación aberrante del Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF-alfa)/JNK e inhibición del SRI-1 en cultivos neuronales hipocámpales (Ma et al., 2009), así como la elevación del SRI-1 pSer307 y la activación de JNK en pacientes *post-mortem* de la EA expuestos a los oligómeros de  $\beta$ A (Bomfim y Ferreira, 2012, Figura 4).

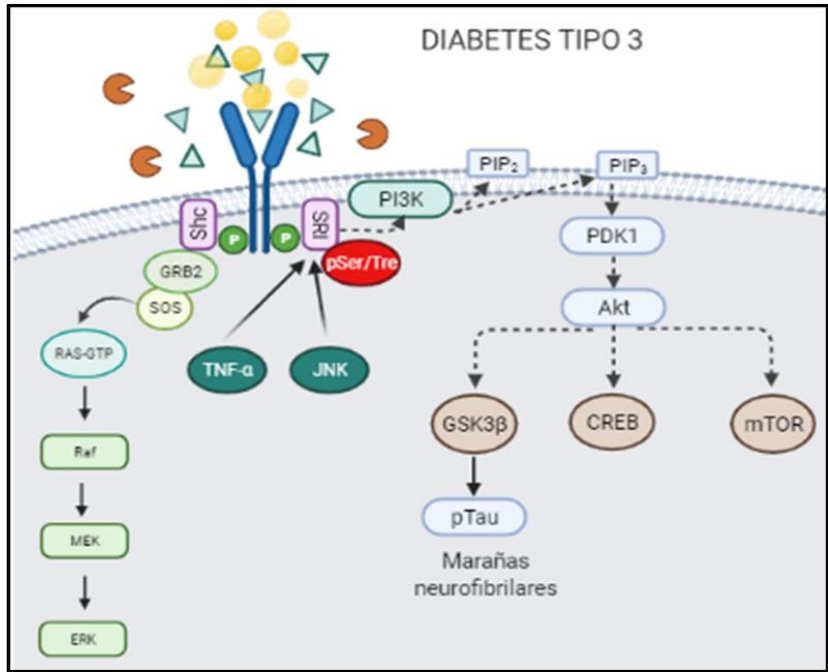
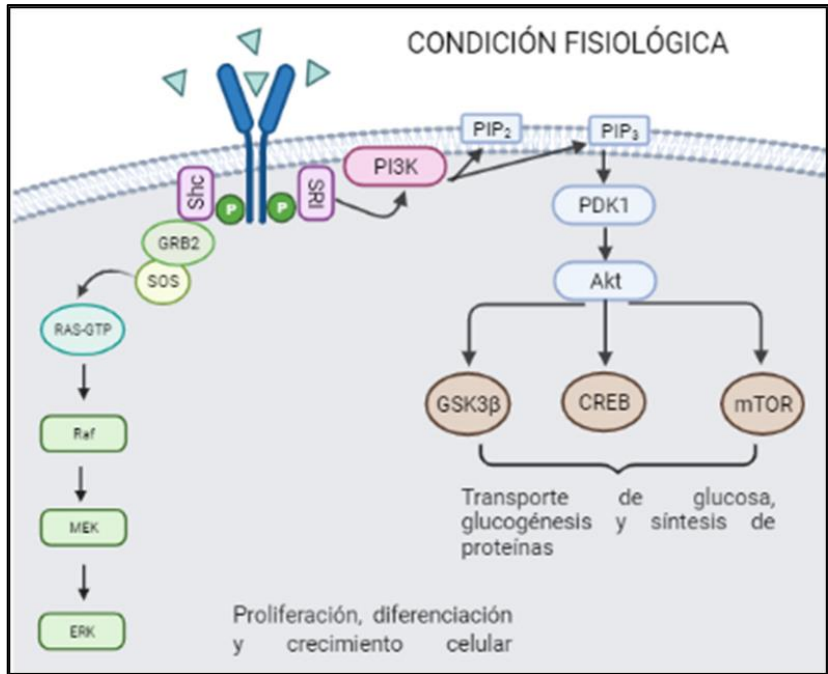


Figura 4. Vía de señalización de la insulina. En situaciones fisiológicas, el RI se encuentra en la membrana celular, permitiendo el ingreso de la insulina (triángulos azules) a la célula. Posteriormente, el RI promueve la asociación de Shc, la cual une el complejo de Grb2/SOS, SOS a su vez activa a Ras (Ras-GTP) y así inicia el encendido de la cascada de las MAP quinasas. Por otro lado, el RI también fosforila el SRI, lo cual activa la vía de PI3K y como consecuencia fosforila a sus sustratos, resultando PIP2 y PIP3. PIP3 sirve de unión para cinasas como PDK y Akt, esta última regula varios de los efectos metabólicos de la insulina a través de la fosforilación de diversos sustratos que propagan la respuesta de la insulina. Por otra parte, la enzima degradadora de insulina (EDI) (figura naranja) degrada la insulina en el espacio extracelular, así como a los oligómeros de  $\beta A$  (círculos amarillos). En la diabetes tipo 3 el SRI sufre fosforilaciones/desfosforilaciones de forma anómala en sus residuos de Ser/Tre, además existe una desensibilización del RI ante la insulina, produciendo una hiperinsulinemia, por lo que la EDI al tener mayor afinidad por la insulina, la degrada y permite la acumulación de los oligómeros de  $\beta A$ . La acumulación del péptido  $\beta A$  desencadena la producción de TNF- $\alpha$  y JNK, lo cual fosforila anormalmente al SRI, alterando la señalización de la insulina, permitiendo la activación de GSK3 $\beta$ , este último activa la pTau, la cual es el responsable de las marañas neurofibrilares. Esto lleva al establecimiento de la EA. Modificado de Olivares y Arellano, (2008) y De Felice, (2014).

Abreviaturas: Akt: Proteína cinasa B, CREB: Proteína de unión al elemento de respuesta al AMP cíclico, EA: Enfermedad de Alzheimer, EDI: Enzima degradadora de insulina, ERK: Cinasa regulada extracelularmente, GSK3 $\beta$ : Glucógeno sintasa cinasa 3 beta, JNK: Cinasa c-Jun N-terminal, MEK: Cinasa de MAP cinasa, mTOR: Molécula blanco de la rapamicina en mamíferos, PDK1: Cinasa dependiente de fosfoinositidos-1, PI3K: Cinasa 3 de fosfoinositol, PIP2 (PI3,4-bisfosfato), PIP3 (PI3,4,5- trisfosfato), pSer/Tre: Residuos fosforilados de Serina/Treonina, pTau: Proteína Tau fosforilada, RI: Receptor de insulina, SRI: Sustrato del receptor de insulina, TNF- $\alpha$ : Factor de necrosis tumoral alfa,  $\beta A$ : Beta amiloide.

Figura 4. Vía de señalización de la insulina.

Entonces, los defectos de la cascada de la insulina a nivel cerebral pueden dar origen a una disfunción sináptica y deterioro de la memoria como los característicos en la EA (Liao et al., 2015). Sin embargo, el cómo los oligómeros y el péptido  $\beta$ A pueden causar resistencia a la insulina a nivel cerebral y eventualmente desencadenar la EA ha permanecido como una pregunta fundamental que continua sin tener respuesta. Sin embargo, a partir de los resultados de diversos estudios, Liao y Xu, 2015 proponen dos hipótesis acerca de esto:

1.- Oligómeros extracelulares: De Felice et al., (2009) demostraron que al administrar oligómeros de  $\beta$ A en cultivos de células hipocampales, estos se unen a los sitios de sinapsis en las dendritas de neuronas hipocampales, causando la remoción e internalización de los receptores de insulina de las dendritas neuronales a las 3 horas y, a las 24 horas, la pérdida de las espinas dendríticas. La administración de insulina exógena previno estos efectos. También, ellos reportaron por el mismo método que la activación de la cascada de la insulina promueve cambios aun no descritos sobre la membrana celular que impiden la unión de los oligómeros de  $\beta$ A sobre las dendritas neuronales. Por lo cual, los oligómeros de  $\beta$ A regulan a la baja el RI, inhiben la señalización de la insulina y por ende impiden también la potenciación a largo plazo y la consolidación de la memoria al evitar la expresión de receptores glutamatérgicos en la membrana celular (Townsend, et al., 2007).

2.- Proteína  $\beta$ A intracelular: La vía Akt modela las respuestas celulares de señalización metabólica y regula funciones homeostáticas (Broughton y Partridge, 2009). Se ha demostrado que la fosforilación y activación de la Akt se ve reducida en tejidos cerebrales con la EA comparado con controles. El mecanismo de acción propuesto para esto es que el péptido  $\beta$ A intracelular inhibe la señalización del RI al interferir en la asociación entre PDK y Akt, evitando los efectos neuroprotectores de la insulina (De Felice y Lourenco, 2014; Hoyer, 2003).

Ambas teorías podrían ser probables con la realidad biológica, ya que ambos objetivos son relevantes para la EA y tanto el péptido  $\beta$ A como los oligómeros de  $\beta$ A podrían actuar tanto intracelular como extracelularmente para promover una disfunción de la cascada de la insulina (De Felice y Lourenco, 2014).

Todavía no es claro cuál es el evento inicial en estas teorías, el péptido  $\beta$ A o los oligómeros de  $\beta$ A. Además, el procesamiento de la PPA y el metabolismo del péptido  $\beta$ A también se encuentra regulado por la enzima degradadora de insulina (EDI), la cual es una proteasa que degrada al péptido  $\beta$ A y la insulina en el cerebro (Kochkina y Plesneva, 2015).

Entonces, aunque no está bien descrita ni comprendida, la disfunción cerebral de glucosa parece ser más la causa que la consecuencia de la neurodegeneración encontrada en la EA esporádica.

La naturaleza específica de la EA y su amplia fase presintomática no permiten el estudio del inicio preciso del ECRI ni del hipometabolismo cerebral durante el tiempo de vida de los pacientes con EA, por lo que los modelos animales con la enfermedad tipo Alzheimer esporádico son usados para vislumbrar este problema.

#### **4. MODELOS ANIMALES DE LA EA**

Ningún modelo animal reproduce en su totalidad los cambios cognitivos, bioquímicos e histopatológicos específicos de los pacientes con la EA sin embargo, la investigación en los modelos permitirá estudiar aspectos específicos de la EA. Los modelos animales de la EA se dividen en tres categorías:

1.- Naturales: Animales como los chimpancés, perros y delfines que desarrollan rasgos fisiopatológicos de la EA de manera natural por el envejecimiento sin embargo, es difícil un estudio a largo plazo por la longevidad de estos organismos (Li, 2013; Palacios y Braid, 2012).

2.- Transgénicos: Existen alrededor de 160 modelos para el estudio de la EA los cuales expresan mutaciones genéticas (Research Models, s/f.), desde roedores, pez cebra, *Drosophila melanogaster* y levaduras, entre otros (Li, 2013). Dentro de este grupo el modelo murino 3xTg es de los ratones transgénicos que cuentan con una mejor descripción y caracterización de los diversos acontecimientos estructurales y conductuales de la EA y sobre el cual se han sentado la mayoría de las bases para los estudios de investigación de nuevos tratamientos farmacológicos para la EA (Oddo et al.,

2003; Sterniczuk et al., 2010a; Sterniczuk et al., 2010b). Este grupo de modelos ha sido propuesto para estudiar la EA en su variante genética.

3.- Inducidos: Con el avance de la ciencia, se ha comprobado que existen diversos agentes que provocan efectos deletéreos que repercuten en la cognición, en la estructura cerebral, en los sistemas colinérgicos, en la neuroinflamación y en el estrés oxidativo que imitan de forma similar las alteraciones encontradas en la EA, ejemplo de ello son los modelos inyectados como, el péptido  $\beta$ A (Kim y Lee, 2016), los iones metálicos o la STZ (Li, 2013), así como otros modelos inducidos como, la bulbectomía olfatoria o los modelos de senescencia acelerada. Estos grupos de modelos han sido propuestos para estudiar la EA en su variante esporádica.

Dada la alta prevalencia de la EA en su variante esporádica (99%) comparada con la variante genética (1%), son prioritarios los estudios que cumplan los requisitos necesarios para estudiar los cambios encontrados en la variante esporádica de la EA. El estudio de estos modelos esporádicos es una prioridad para el desarrollo de conocimiento fundamental sobre el proceso de neurodegeneración de la EA esporádica. Además esto cobra relevancia porque crea las bases para la elaboración y utilización de modelos de la EA para futuros estudios preclínicos con agentes farmacológicos para el tratamiento de la EA esporádica (Gulyaeva et al., 2017).

## **5. ESTREPTOZOTOCINA**

La STZ es un fármaco creado a finales de los años 50 a partir de *Streptomyces achromogenes* (Szkudelski, 2001). Su primer uso fue como antibiótico, después como anticancerígeno y en los últimos años únicamente es utilizado en modelos de investigación para el desarrollo de diabetes tipo 1 (DT1), siendo de uso más reciente para el desarrollo de neurodegeneración tipo Alzheimer de manera esporádica (Grieb, 2016).

La primera descripción de la STZ como modelo para la EA fue dada por el profesor Siegfried Hoyer en el año de 1995, al notar que a los animales a los que se les administraba STZ para inducir diabetes también presentaban deterioro cognitivo que no aparecía con otros fármacos causantes de diabetes. Por esto, el profesor Hoyer decidió



administrar la STZ de manera icv en una dosis sub diabetogénica (3 mg/kg) y describir sus efectos (Muller et al., 1995).

La estructura de la STZ consiste en una molécula de glucosa unida a un grupo nitrosurea. Por su alta toxicidad solo se indica en seres humanos como tratamiento de segunda o tercera línea ante tumores neuroendocrinos pancreáticos. Por vía sistémica, tiene una vida media < 1 hora, se distribuye en células beta pancreáticas, riñón e hígado, presenta un metabolismo hepático y una excreción renal. Ante su administración vía intraperitoneal, al cerebro no se ve afectado por efecto directo de la STZ porque no cruza la barrera hematoencefálica por falta de transportadores de glucosa tipo 2 (GLUT-2) a este nivel sin embargo, no se descarta una afectación cerebral causada de manera indirecta por los daños sistémicos ocasionados por este fármaco (Grieb, 2016). La STZ se une a los GLUT-2, los cuales a nivel sistémico se encuentran en páncreas, riñón, hígado y médula ósea, de ahí radica la diversidad de los efectos adversos. A nivel del sistema nervioso central, se ha descrito la presencia de GLUT-2 en las neuronas de la capa granular del giro dentado, del núcleo endopiriforme dorsal, del globo pálido interno, del núcleo hipotalámico arcuato y paraventricular, de la medula oblongada dorsomedial, del estriado ventral, del núcleo amigdalino medial y dorsal, del núcleo del tracto solitario, de la formación reticular ventral, del núcleo del lecho de la estría terminal, del núcleo supraquiasmático, del área retroquiasmática del hipotálamo, del núcleo talámico paraventricular y núcleo habenular, del complejo olivar inferior, de los núcleos del rafé, de las cortezas temporales, perirrinales y en el hipocampo; mientras que en los astrocitos el GLUT-2 se encuentra en la neocorteza y en el hipocampo dorsal (Arлуison et al., 2004; Leloup et al., 1994). La STZ al internalizarse en la célula produce la metilación del ADN, promoviendo la apoptosis celular (Knezovic et al., 2017)

A partir del 2012 la popularidad del fármaco creció dentro del campo de la investigación básica para ser un modelo de neurodegeneración tipo EA en su variante esporádica. Por presentar deterioro en la memoria y aspectos patológicos similares a los presentes en la EA se le ha dado preferencia para estudiar nuevas estrategias terapéuticas en el tratamiento de la EA (Knezovic et al., 2013). También, destaca la utilización del modelo para el estudio de la diabetes tipo 3.

Por otra parte, Knezovic y colaboradores en 2015, caracterizaron la administración icv de STZ en ratas Wistar macho de 3 meses de edad con diferentes dosis (0.3 mg/kg, 1 mg/kg, 3 mg/kg) durante un periodo de 9 meses. Encontraron deterioro de la memoria espacial en el LAM a partir del primer mes posterior a la inyección con STZ. Este déficit fue dependiente de la dosis y del tiempo porque existió una recuperación desde el primer al tercer mes y, es a partir de este último mes que los cambios se hacen crónicos, excepto con la dosis de 0.3 mg/kg donde este déficit fue reversible. Además, demostraron la fosforilación de la proteína tau y el depósito de placas de péptido  $\beta$ A a partir del primer y del tercer mes, respectivamente, en la neocorteza y en el hipocampo.

En los estudios de Osmanovic Barilar et al., (2014) emplearon ratas Wistar macho de 3-4 meses de edad tratadas con STZ icv (3 mg/kg) y midieron por RT-PCR y Western blot a los 0.5, 1, 3, 6 y 9 meses después de la administración de STZ la expresión del mRNA y de proteínas involucradas en la señalización de la insulina, como: el RI, la EDI y la insulina en el hipocampo. Demostraron en los animales lo siguiente: aumento en la expresión del mRNA del RI después de 15 días con un consiguiente decremento al mes, que se mantuvo hasta los nueve meses; mientras que la proteína del RI se encontró disminuida en el primer, tercer y sexto mes, sin cambios significativos en el noveno mes. El mRNA de la insulina permaneció sin cambios durante dos semanas, pero de los 3 a los 9 meses posteriores a la administración de STZ existió un decremento permanente, cabe aclarar que no se evaluó la proteína de la insulina, pero los autores sugieren un comportamiento similar al de su mRNA. El mRNA de la EDI presentó un incremento durante las primeras dos semanas y, empezó a disminuir durante 3, 6 y 9 meses comparado con el grupo control; mientras que la proteína total de la EDI se encontró disminuida a partir del primer mes comparado con el grupo control y permaneció disminuida durante el resto del experimento. Los autores concluyen que la expresión del mRNA del RI se afecta antes que la proteína del RI como resultado de una respuesta aguda ante la administración de STZ icv. En cuanto a los resultados de la EDI, concluyen que puede ser causados por una disminución de la estabilidad o aumento en la degradación de esta enzima, dado que los niveles de proteína no se asociaron con los del mRNA.

Aunque se ha argumentado el daño directo en el RI por la STZ, esta última entra a la célula como un sustrato para el GLUT-2, el cual se encuentra en altas cantidades a nivel pancreático, pero en menor cantidad en cerebro. El GLUT-2 a nivel cerebral se ve implicado en el transporte e internalización de la glucosa. Loncar et al., (2017) determinaron los cambios en la relación RI/GLUT-2 una hora después de una inyección de STZ (1.5 mg/kg) icv, en sus resultados encontraron un incremento de la expresión del GLUT-2 y decremento de la expresión del RI en áreas cercanas a la inyección (hipocampo) y en estructuras paralelas a la dirección del flujo del líquido cefalorraquídeo. La respuesta del aumento de GLUT-2 ante la administración de STZ, contrario a lo descrito en el páncreas, se la atribuyen a la respuesta y al ajuste metabólico que una célula puede realizar en una etapa tan aguda (< 1 h) ante un estímulo nocivo como lo es la STZ, sin embargo, puede que esta respuesta se pierda en el tiempo. Concluyen que estos hallazgos apoyan la teoría que el RI y la alteración en su cascada puede ser afectada por la STZ desde un mecanismo intracelular y no uno extracelular, por lo cual los cambios en el RI y su cascada son consecuencia de la unión entre la STZ con su blanco farmacológico (el GLUT-2) en la misma célula, relación que necesita ser explorada.

Por último, Zappa Villar et al., 2018, reportaron en ratas Sprague Dawley de 3 meses con STZ icv, a una dosis de 3 mg/kg, una disminución en el CA3 del árbol dendrítico de los astrocitos y en CA1, una reducción en el volumen del *stratum radiatum* y menor densidad neuronal comparado con los controles. A la fecha este es el único reporte con STZ icv que describe resultados por regiones y estratos hipocampales.

Mientras que los argumentos postulados arriba tratan sobre la pura caracterización de la STZ icv y sus efectos de neurodegeneración tipo EA esporádica, la mayoría de la caracterización publicada sobre este modelo se ha dado al introducir un fármaco o compuesto con el efecto contrario de por medio, esta es una de las razones por las cuales el modelo solo ha sido caracterizado de forma descriptiva, sin involucrarse en los mecanismos del porque se modifica la memoria, el estrés oxidativo, la neuroinflamación o la cascada de insulina, todos factores implicados en la EA. Además, la mayoría de estas investigaciones son realizadas en ratas con resultados no coincidentes entre autores

referente a los hallazgos en la memoria espacial, presencia del péptido  $\beta$ A y alteraciones de la cascada de insulina en periodos de tiempo determinados (15 y 30 días los periodos mas estudiados). Asimismo, son pocos los estudios que involucran ratones. Por otra parte, aunque ya existen reportes con metodología diferente donde explican la relación de la cascada de la insulina con la plasticidad sináptica, al ser este un modelo de neurodegeneración tipo EA esporádica donde su mayor ventaja recae en el estudio de la resistencia a la insulina, realmente no existe información que interprete en este modelo la relación entre las modificaciones en la cascada de la insulina con el deterioro en la memoria. Finalmente, la mayor parte de la caracterización de este modelo ha sido mediante la técnica de Western blot en el hipocampo, aunque es útil para explicar los cambios encontrados en la totalidad del hipocampo, son escasos los estudios que vayan más allá a desglosar los hallazgos por medio del estudio de las regiones hipocampales o incluso por estratos. Por estas razones es que se propone este proyecto.

## **6. JUSTIFICACIÓN**

Dado que se ha demostrado una asociación entre la resistencia a la insulina y la EA, estudiar los mecanismos celulares involucrados en esta relación en los seres humanos durante etapas tempranas de la patología es un reto para la investigación. Por lo que son necesarias aproximaciones experimentales con el uso de modelos animales que puedan simular estas alteraciones. Caracterizar de forma temprana (15 y 30 días) el modelo de administración icv de STZ para generar neurodegeneración tipo EA, permitirá saber si presenta depósito del péptido  $\beta$ A; de la misma forma permitirá conocer si existen modificaciones en los elementos de la vía de señalización de la insulina como el RI y el pSRI-1 (Ser307) en el CA1 y el CA3 del hipocampo dorsal, así como su conducta en pruebas de memoria espacial. Solo caracterizando este modelo es que podrá utilizarse en estudios posteriores para probar tratamientos contra la EA.

## **7. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

En el modelo de STZ icv para generar neurodegeneración tipo EA, ¿Cuál es el impacto a los 15 y 30 días sobre 1) la glucosa en sangre 2) la memoria espacial, 3) el depósito del péptido de  $\beta$ A y 4) los receptores de insulina en el CA1 y CA3 del hipocampo dorsal?

## 8. HIPÓTESIS

- Se mantendrán euglucémicos los ratones a los cuales se les administre STZ.
- Existirá deterioro en el aprendizaje espacial a los 15 días en los ratones a los cuales se les administre STZ.
- Existirá deterioro en la memoria espacial a los 15 días en los ratones a los cuales se les administre STZ.
- Existirá deterioro en el aprendizaje espacial a los 30 días en los ratones a los cuales se les administre STZ.
- Existirá deterioro en la memoria espacial a los 30 días en los ratones a los cuales se les administre STZ.
- Habrá una disminución en el receptor a insulina a los 15 días en el CA1 del hipocampo dorsal de ratones a los cuales se les administre STZ.
- Habrá una disminución en el receptor a insulina a los 30 días en el CA1 del hipocampo dorsal de ratones a los cuales se les administre STZ.
- Habrá una disminución en el receptor a insulina a los 15 días en el CA3 del hipocampo dorsal de ratones a los cuales se les administre STZ.
- Habrá una disminución en el receptor a insulina a los 30 días en el CA3 del hipocampo dorsal de ratones a los cuales se les administre STZ.
- Habrá un aumento del pSRI-1 Ser307 a los 15 días en el CA1 del hipocampo dorsal de ratones a los cuales se les administre STZ.
- Habrá un aumento del pSRI-1 Ser307 a los 30 días en el CA1 del hipocampo dorsal de ratones a los cuales se les administre STZ.
- Habrá un aumento del pSRI-1 Ser307 a los 15 días en el CA3 del hipocampo dorsal de ratones a los cuales se les administre STZ.
- Habrá un aumento del pSRI-1 Ser307 a los 30 días en el CA3 del hipocampo dorsal de ratones a los cuales se les administre STZ.
- Estará presente el péptido  $\beta$ A a los 15 días en el CA3 del hipocampo dorsal de ratones a los cuales se les administre STZ.
- Estará presente el péptido  $\beta$ A a los 30 días en el CA3 del hipocampo dorsal de ratones a los cuales se les administre STZ.

## 9. OBJETIVO GENERAL

Establecer si existe deterioro en el aprendizaje y en la memoria espacial por medio de la tarea del LAM, así como valorar la presencia del péptido de  $\beta$ A en el hipocampo dorsal y la expresión del RI y del pSRI-1 (Ser307) en el CA1 y CA3 del hipocampo dorsal de ratones a los 15 y 30 días posteriores a la inyección de estreptozotocina.

## 10. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Valorar si existe deterioro en el aprendizaje y en la memoria espacial en la tarea del laberinto acuático de Morris a los 15 y 30 días post-STZ icv.
- Determinar si existen alteraciones en la glucemia de los animales a los 15 y 30 días post-STZ icv.
- Evaluar en el CA1 y CA3 del hipocampo dorsal de los ratones, a los 15 y 30 días post-STZ icv, la presencia del péptido  $\beta$ A y la existencia de alteraciones en la expresión del RI y del pSRI-1 (Ser307).

## 11. SUJETOS, MATERIAL Y MÉTODO

### 11.1 Sujetos

Se utilizaron ratones de la cepa CD1 machos de 10 semanas de edad, los cuales se dividieron de manera aleatoria de acuerdo a grupo y camada en cajas de 5 animales, se alojaron en un cuarto con ciclo de luz invertida (12-12, iniciando a las 8:00h), con temperatura de  $21 \pm 2$  °C, alimentados con dieta de Labdiet Formula 5008 y agua purificada *ad libitum*, acorde a lo establecido en la Norma Oficial Mexicana, NOM-062-ZOO-1999. Los animales permanecieron 7 días en ese cuarto antes de iniciar la fase experimental.

Tabla 1. Se muestra la distribución conductual e histológica de los animales por grupo y por condición experimental. RI: Receptor de insulina, pSRI-1 (Ser307): Sustrato del receptor de insulina 1 fosforilado en el residuo de serina 307, LCRa: Líquido cefalorraquídeo artificial, STZ: Estreptozotocina.

Distribución	Conductual		Histológica (RI)		Histológica (pSRI-1 (Ser307))	
	Vehículo	Experimental	Vehículo	Experimental	Vehículo	Experimental
15 días	LCRa (n= 10)	STZ (n=7)	LCRa (n= 4)	STZ (n=4)	LCRa (n= 4)	STZ (n=5)
30 días	LCRa (n= 8)	STZ (n=8)	LCRa (n= 4)	STZ (n=4)	LCRa (n= 5)	STZ (n=5)

## **11.2 Cirugía estereotáxica**

Para producir el modelo de STZ icv para generar neurodegeneración tipo EA, en cada animal se realizaron dos cirugías estereotáxicas en los ventrículos laterales diferidas por 48 horas (DeVos y Miller, 2013). Las coordenadas estereotáxicas para las cirugías fueron (AP: +0.3 mm, ML:  $\pm$  1.0 mm, DV: +3.0 mm) (DeVos y Miller, 2013).

Primero, los ratones fueron anestesiados con ketamina (100 mg/kg) y xilacina (20 mg/kg) vía intraperitoneal (Peña et al., 2010). Después, en el cerebro se llevo a cabo la primera cirugía en el ventrículo lateral derecho y 48 h después en el ventrículo contralateral. En cada cirugía los animales se fijaron en un aparato estereotáxico y se les realizó una incisión sagital en el dorso de la cabeza, desde la región prefrontal hasta lambda, luego realizando antisepsia de la región se ubicó bregma, y con una jeringa Hamilton de 10  $\mu$ l de calibre 26 y diámetro externo de 0.47 mm, se administró icv el líquido cefalorraquídeo artificial (LCR artificial, NaCl 119 mM, Glu 30 mM, NaHCO<sub>3</sub> 25 mM, KCl 3 mM, MgCl<sub>2</sub> 2.5 mM, CaCl<sub>2</sub> 1.5 mM, gaseado con carbógeno (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) pH 7.4) (Ordaz et al., 2010) para el grupo vehículo (VEH) o bien, LCR artificial más estreptozotocina a una dosis de 3 mg/kg para el grupo estreptozotocina (STZ, Mehla et al., 2013). El volumen del LCR artificial inyectado fue con base en el peso corporal del animal, con un volumen de 5  $\mu$ l (administrado en 3 min) de LCR artificial por cada 40 gr de peso corporal (Biasibetti et al., 2017). Posteriormente se realizó antisepsia de la zona y se suturó con hilo seda 3-0. Finalmente, los animales se vigilaron y colocaron cerca de un calefactor hasta su recuperación.

## **11.3 Laberinto Acuático de Morris (LAM)**

Se evaluó el aprendizaje y la memoria espacial de los ratones a los 15 y 30 días después de la segunda administración de LCR artificial o STZ (ver distribución de los grupos en la Tabla 1) en el LAM (Puzzo et al., 2014). La tarea se realizó en un tanque circular de 100 centímetros de diámetro con fondo negro, con el agua teñida con anilina negra y con una plataforma de acrílico negra (8x8x15 cm) localizada en el centro de un cuadrante designado y sumergida 0.5 cm bajo el agua. El tanque se encontró en un cuarto de luz

blanca a 15 luxes, a 21°C y con 8 pistas espaciales colcoadas en las paredes las cuales se mantuvieron en el mismo lugar durante todos los ensayos.

Se realizaron 3 sesiones de manipulación previas al entrenamiento con duración de 3 minutos cada una. Cada sesión inició realizando un acercamiento suave hacia el animal y tomándolo de la base de la cola se colocó sobre la mano ahuecada del experimentador permitiendo al animal caminar libremente. Posteriormente, con la mano contralateral se cubrió la mano donde se encontraba el animal formando una esfera con las dos manos donde el ratón se encontraba dentro. Luego, se acarició al animal en forma circular sin ejercer presión. Este mismo procedimiento se repitió con una toalla seca hasta completar los 3 minutos.

Veinticuatro horas después se realizó la sesión de entrenamiento que consistió en 4 ensayos diarios durante 4 días consecutivos. Cada ensayo consistió en introducir al animal en el tanque desde uno de los 4 diferentes puntos de liberación alrededor del tanque (norte, sur, este y oeste), los cuales fueron constantes para todos los animales en cada ensayo (Gómez-Padilla y Bello-Medina, 2019) (Figura 5). En el primer día de entrenamiento y antes de iniciar los ensayos, cada animal fue colocado una sola vez sobre la plataforma durante 20 segundos con el fin de que la conociera. Posteriormente, en cada ensayo al animal le fue permitido nadar por un máximo de 60 segundos y le fue permitido permanecer en la plataforma por 20 segundos, después de cumplido el tiempo, el animal fue puesto sobre una toalla y en la caja de espera hasta su siguiente ensayo. Si el animal no encontró la plataforma en el tiempo estipulado, solamente en el primer ensayo de la primera sesión de entrenamiento se le guió manualmente hacía ella (Escobar et al., 1999). Durante cada ensayo la latencia de escape de cada animal fue medida manualmente (Gulinello y Gertner, 2009).

Veinticuatro horas después de la última sesión de entrenamiento, se realizó la sesión de prueba que consistió en el retiro de la plataforma y solamente una vez se introdujo al animal en el tanque desde el punto este, se le permitió nadar libremente durante 60 s después de los cuales, se retiró al animal para ser puesto nuevamente en su caja.



## Definiciones

*Latencia de escape:* Tiempo (s) que tarda el animal en nadar desde su punto de liberación hasta que sube a la plataforma.

*Número de entradas:* Número de veces que el animal entra en cada cuadrante del tanque.

*Velocidad:* Relación entre la distancia que recorre el animal y el tiempo que invierte en ello (m/s).

*Tiempo de permanencia:* Periodo de tiempo (s) que permanece el animal dentro de cada cuadrante del tanque.

*Distancia recorrida:* Distancia total (cm) recorrida dentro del tanque.

*Distancia al objetivo:* Distancia recorrida (cm) desde el punto de liberación hasta el lugar de la plataforma.

Tabla 2. Se muestra el orden cronológico en el cual los animales fueron liberados en el tanque acuático durante la fase de entrenamiento del LAM

	<b>Ensayo 1</b>	<b>Ensayo 2</b>	<b>Ensayo 3</b>	<b>Ensayo 4</b>
<b>Sesión 1</b>	Este	Sur	Oeste	Norte
<b>Sesión 2</b>	Sur	Este	Norte	Oeste
<b>Sesión 3</b>	Norte	Oeste	Este	Sur
<b>Sesión 4</b>	Oeste	Norte	Sur	Este

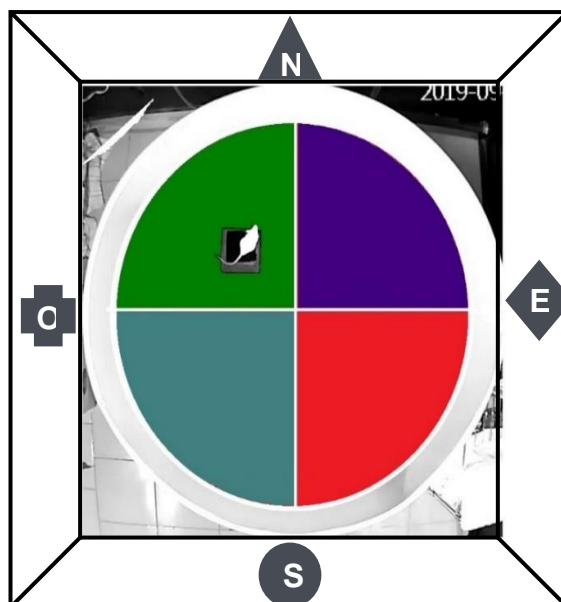


Figura 5. Plano del tanque para el LAM donde se representan los 4 cuadrantes de diferente color. También, se visualizan las claves espaciales que rodean al tanque para la localización espacial de la plataforma, la cual está sumergida en el centro de un cuadrante previamente escogido. N (norte), S (sur), E (este), O (oeste) como los puntos cardinales de los cuales se liberaron los animales.

#### 11.4 Eutanasia y obtención de muestras

Cuarenta y ocho horas después de la sesión de retención se realizó la eutanasia de los animales por dislocación cervical. Luego, se obtuvo una gota de sangre a partir del corte de la cabeza para valorar que la STZ no causara efectos sistémicos. La sangre se analizó por medio de una tira reactiva en el glucómetro Ultra Touch Ultra 2 de Johnson y Johnson. Dado que esta evaluación se realizó como punto de control de la inyección icv de STZ, los animales se mantuvieron con libre acceso a agua y alimento y se mantuvo control sobre las variables: horario de toma de muestra, sitio de obtención de la muestra, experimentador y equipo de medición.

A continuación, el cerebro fue extraído rápidamente (<3 min) con equipo de micro disección y por medio de la técnica de congelación en fresco fue sumergido en 2-metil butano rodeado de hielo seco y etanol al 90% durante dos minutos. Las muestras extraídas se mantuvieron a -80 °C para su análisis posterior.

## **11.5 Manejo de los tejidos**

Se realizó acorde a lo estipulado por Carasatorre et al. (2015) y González-Franco et al. (2017). Primero, en una matriz de acero inoxidable (Electron Microscopy Sciences) a -20°C se colocó el cerebro en posición longitudinal y con cuchillas para criostato se realizaron cortes coronales para obtener la sección del hipocampo, separando primero el cerebelo y posteriormente se realizó un corte de 4 mm que contuvo todo el hipocampo dorsal. En un criomolde de plástico rectangular se colocaron 8 cortes que contenían al hipocampo dorsal, después se realizó un bloque cubriendo la totalidad de los cortes dentro del criomolde con Tissue Tek O.C.T (Sakura Finetek), posteriormente el criomolde se depositó en hielo seco cuidando no entrar en contacto directo con el tejido, el bloque se mantuvo a -20°C en todo momento. Cada bloque contuvo cerebros de cada condición experimental (ver distribución de los grupos en la Tabla 1) y estos se colocaron en posiciones diferentes por cada bloque. Por medio de un criostato (Leica) a -20°C, el hipocampo dorsal fue cortado en cortes coronales de 30  $\mu\text{m}$  y fueron colocados en portaobjetos gelatinizados. Las laminillas permanecieron a temperatura ambiente por 24 h y posteriormente a -20°C durante 5 días antes de ser utilizadas. Se obtuvieron 4 bloques en total, dos bloques para el periodo de 15 días y dos bloques para el periodo de 30 días, con una n = 4-5 para cada grupo (4 grupos en total).

## **11.6 Inmunofluorescencia**

Para cada anticuerpo evaluado, se seleccionaron cinco laminillas de cada bloque que contuvieran al hipocampo dorsal {Bregma -1.70 a -2.18, (Paxinos y Franklin, 2004)} acorde al método morfométrico sistemático estipulado por Rosen y Harry, 1990. Las laminillas se fijaron con paraformaldehído al 2% con pH de 7.4 por 10 min, lavadas con Tris-Buffer Salino (TBS) y TBS-T (TBS-tween) por 5 minutos, el bloqueo se realizó con 1  $\mu\text{l}$  de tritón y con el buffer de bloqueo incluido en el kit de amplificación de señal de tiramida (TSA, PerkinElmer Life Sciences). Los cortes montados en las laminillas fueron incubados con el anticuerpo policlonal anti-rabbit phospho-IRS1 (Ser307, ThermoFisher #PA1-1054) o con el anticuerpo monoclonal anti-rabbit para el RI  $\beta$  (4B8, Cell Signaling #3025) o con el anticuerpo policlonal anti-rabbit  $\beta\text{A}$  (1-42, ThermoFisher #44-344) en concentración de 1:400. Después, el phospho-IRS1 se incubó durante dos horas a

temperatura ambiente, cumplido este tiempo y para el resto de los anticuerpos se dejaron a 4°C toda la noche. Luego de la incubación fueron lavados con TBS y TBS-T por 5 min. Para el RI  $\beta$  y el péptido  $\beta$ A antes de aplicar el TSA se realizó el bloqueo de peroxidasas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 2% durante 20 minutos y para el phospho-IRS1 se realizó al siguiente día de aplicar el anticuerpo. La incubación con el anticuerpo policlonal secundario acoplado a fluoróforo {1:400, Donkey Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor® 488), ThermoFisher, # A-21206} se realizó por 3 horas a temperatura ambiente tanto para el RI  $\beta$  como para el péptido  $\beta$ A con lavados posteriores con TBS-T y TBS, mientras que para el phospho-IRS1 fue por dos horas a temperatura ambiente y después a 4°C toda la noche. El tejido fue contrateñido con la tinción de Nissl fluorescente (1:100, NeuroTrace Fluorescent Nissl Stains #N-21481, ThermoFisher). Finalmente, los tejidos fueron cubiertos con el medio de montaje VectaShield (Vector Laboratories) y un día después sellados con esmalte de uñas, las muestras fueron almacenadas en la oscuridad a 4°C hasta su uso. Para la estandarización de la técnica de inmunofluorescencia del péptido  $\beta$ A 1-42, se utilizó el cerebro de una ratona 3x-Tg de 10 meses de edad como control positivo.

### **11.7 Adquisición y análisis de imágenes**

Se obtuvieron imágenes simples en mosaico por medio del microscopio para fluorescencia AxioImager vertical (Apotome Zeiss) utilizando un lente objetivo apocromático de 10x/0.45. Se usó el filtro de GFP (emisión 488 nm) para la detección del phospho-IRS1, del RI  $\beta$  y del péptido  $\beta$ A; el filtro de rodamina (emisión 565 nm) para la detección del Nissl fluorescente. Por medio del módulo MosaiX se obtuvieron imágenes que cubrieron toda el área del hipocampo. Los parámetros para la adquisición de imágenes fueron establecidos en el animal vehículo de cada laminilla, una vez establecidos, estos fueron constantes para el resto de los tejidos en esa laminilla. Para el phospho-IRS1 y el RI  $\beta$  se obtuvieron hasta 10 imágenes del hipocampo por animal (5 imágenes por hemisferio, 5 laminillas con secciones del cerebro del mismo animal).

Para establecer la presencia del péptido  $\beta$ A se realizó un rastreo de la totalidad del tejido presente en la laminilla y se tomó una fotografía de la región con mayor intensidad de señal presente en el control positivo, en el resto de los grupos se tomó la fotografía en esa misma región.

Para el phospho-IRS1 y el RI  $\beta$ , el análisis se realizó por medio del programa FIJI (Fiji is just ImageJ). La persona que realizó el análisis fue ciega ante todas las condiciones experimentales de las imágenes analizadas. Todas las imágenes fueron pre-procesadas con un filtro para reducción de ruido antes del análisis a partir de un animal vehículo de cada laminilla, ese filtro fue mantenido para el resto de los tejidos de esa laminilla. Luego, cada imagen fue dividida en 8 regiones de interés para segmentar diversas porciones del CA1 y CA3. El CA1 se subdividió en: la capa piramidal, el *stratum oriens* y el *stratum radiatum*. La región de CA3 se subdividió en: la capa piramidal, el *stratum oriens* y el *stratum lucidum*. Por último, también se delimitó el área del giro dentado (GD) y el *stratum lacunosum molecular* (GD-LM) (Figura 6).

Se utilizó la señal de Nissl fluorescente en el canal de color gris como guía para delimitar las regiones de interés. Los tejidos que se encontraron incompletos o rotos fueron descartados. Posteriormente, basados en el método de González-Franco et al., 2017, un umbral de detección en el canal de color gris fue establecido en cada laminilla a partir del tejido de un animal vehículo de esa laminilla y se marcó el umbral para la

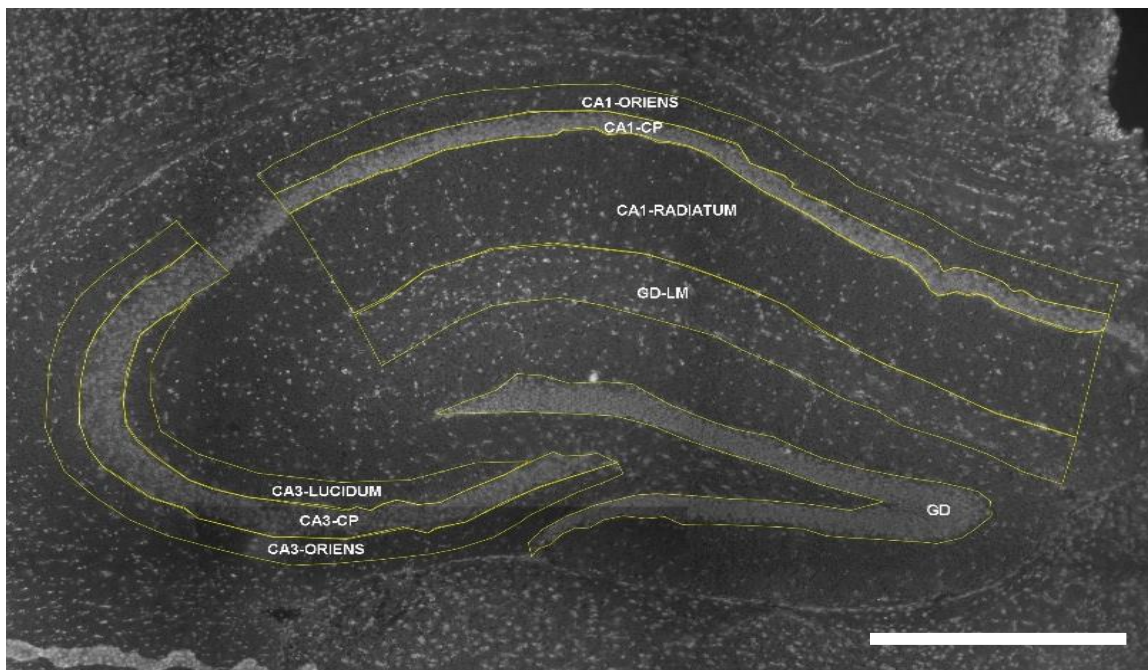


Figura 6. Imagen representativa que muestra las regiones de interés delimitadas dentro de los diversos segmentos del hipocampo dorsal con la señal de la tinción de Nissl fluorescente en el canal de color gris. El CA1 se subdividió en: la capa piramidal (CA1-CP), el *stratum oriens* (CA1-Oriens) y el *stratum radiatum* (CA1-Radiatum). La región de CA3 se subdividió en: la capa piramidal (CA3-CP), el *stratum oriens* (CA3-Oriens) y el *stratum lucidum* (CA3-Lucidum). Por último, se delimitó el área del giro dentado y el *stratum lacunosum molecular* (GD-LM). La barra representa 500  $\mu\text{m}$ .

detección de señal en cada laminilla y en cada anticuerpo evaluado, el RI  $\beta$  y el phospho-IRS1. Después, con estos umbrales establecidos se evaluó la densidad óptica relativa (DOR) que es el producto del área y el valor gris promedio (suma de todos los píxeles grises entre el total de píxeles para la región de interés), el resultado de las mediciones fue expresado en píxeles (Bankhead, 2016).

Posteriormente, tanto para el RI  $\beta$  como para el phospho-IRS1, se desenmascaró al analizador el código de grupo de cada tejido estudiado, y en cada animal los resultados fueron promediados para terminar obteniendo la DOR de cada región de interés de ambos hemisferios para cada animal estudiado.

### **11.8 Análisis estadístico**

Para el análisis de la glucosa en sangre y la velocidad promedio, las diferencias entre grupos fueron analizadas por medio de una t-student no pareada o ANOVA de una vía. Dependiendo el caso, se realizó ANOVA de dos vías de medidas repetidas o solo ANOVA de dos vías para el análisis estadístico de la conducta seguido de un *post hoc* de Bonferroni-Dunn cuando fue apropiado. Para el análisis estadístico de la histología, las diferencias entre grupos fueron analizadas por medio de t-student no pareada. El análisis estadístico de la ANOVA se realizó por medio del programa StatView versión 5.0.1 y las gráficas y el análisis estadístico de la t-student se realizó en GraphPad Prism versión 8.3.0.

## **12.RESULTADOS**

### **12.1 La glucosa sanguínea no se altera por inyecciones icv de STZ**

La prueba t-student indicó que no existen diferencias significativas en la concentración de glucosa en sangre entre el grupo VEH y STZ a los 15 días ( $t_{(15)} = 0.35$ ;  $p = 0.72$ , Figura 7A) ni a los 30 días ( $t_{(14)} = 1.4$ ;  $p = 0.16$ , Figura 7B) posteriores a la inyección.

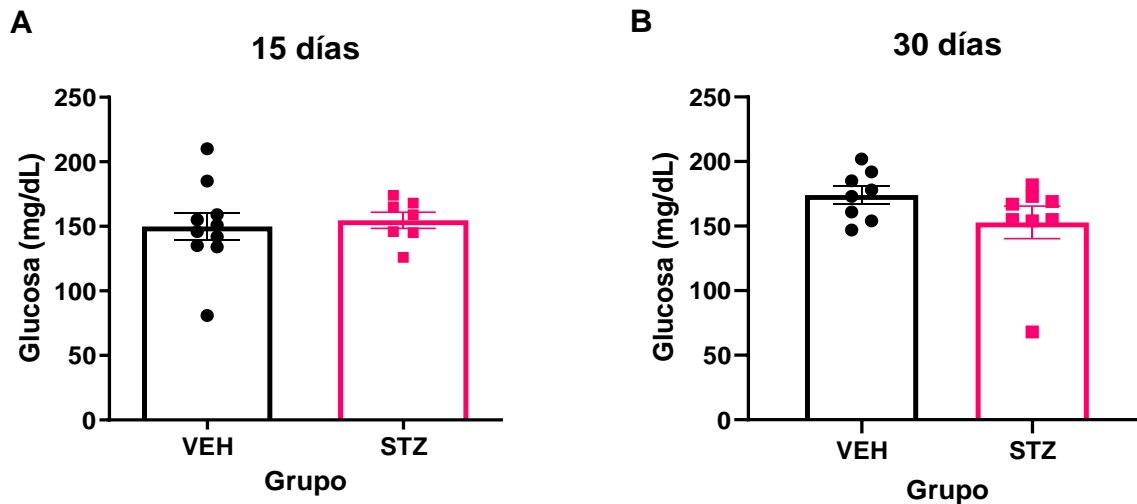


Figura 7. Se muestra la media, el error estándar y la distribución individual de los valores de glucosa en sangre de los grupos VEH y STZ de 15 (A) y 30 días (B). Estadísticamente no existen diferencias entre los grupos ( $p > 0.05$ ).  $n = 7-10$  por grupo.

## 12.2 Efecto de la STZ sobre el aprendizaje espacial

### 12.2.1 La STZ imposibilita la curva de aprendizaje a los 15 días

Para evaluar el aprendizaje espacial en el grupo de 15 días se analizaron las latencias de escape durante el entrenamiento en la tarea de LAM de los grupos VEH y STZ. Se aplicó un ANOVA de dos vías de medidas repetidas y se encontraron diferencias en el factor tiempo ( $F_{(3, 42)} = 4.63$ ,  $p = 0.006$ ), pero ninguna entre el factor grupo ( $F_{(1, 42)} = 1.12$ ;  $p = 0.30$ ) y, tampoco se observó una interacción entre los factores tiempo y grupo ( $F_{(3, 42)} = 0.21$ ;  $p = 0.88$ ). La prueba *post hoc* de Bonferroni/Dunn muestra que para el grupo VEH las diferencias se encuentran entre las sesiones 1 vs 2 ( $p = 0.004$ ) y 1 vs 4 ( $p = 0.001$ ); y para el grupo STZ no hubo diferencias entre sesiones, lo cual indica la existencia de una curva de aprendizaje para el grupo VEH (Figura 8A).

También, se evaluó la velocidad promedio durante la sesión de entrenamiento de los grupos VEH y STZ. Se aplicó una t-student no pareada y no se encontraron diferencias significativas ( $t_{(15)} = 1.60$ ;  $p = 0.12$ ), esto nos indica que no existen problemas de motricidad entre los grupos estudiados (Figura 8C).

### **12.2.2 La STZ no modifica el aprendizaje espacial a los 30 días**

Para evaluar el aprendizaje espacial en el grupo de 30 días se evaluaron las latencias de escape durante el entrenamiento en la tarea de LAM de los grupos VEH y STZ. Se aplicó un ANOVA de dos vías de medidas repetidas y se encontraron diferencias en el factor tiempo ( $F_{(3, 42)} = 23.22$ ;  $p < 0.001$ ), aunque no se encontraron diferencias significativas entre el factor grupo ( $F_{(1, 42)} = 0.36$ ;  $p = 0.55$ ) y, tampoco se observó una interacción entre los factores tiempo y grupo ( $F_{(3, 42)} = 2.7$ ;  $p = 0.057$ ). La prueba *post hoc* de Bonferroni/Dunn demuestra que para el grupo VEH las diferencias se encuentran entre las sesiones 1 vs 2 ( $p = 0.004$ ), 1 vs 3 ( $p = 0.001$ ), 1 vs 4 ( $p < 0.001$ ); y para el grupo STZ entre las sesiones 1 vs 2 ( $p < 0.001$ ), 1 vs 3 ( $p < 0.001$ ) y 1 vs 4 ( $p < 0.001$ ), lo cual indica la existencia de una curva de aprendizaje para los dos grupos (Figura 8B).

También, se evaluó la velocidad promedio durante la sesión de entrenamiento de los grupos VEH y STZ. Se efectuó una t-student no pareada y no se encontraron diferencias significativas ( $t_{(14)} = 0.08$ ;  $p = 0.93$ ), esto nos indica que no existen problemas de motricidad entre los grupos estudiados (Figura 8D).

## **12.3 Efecto de la STZ sobre la memoria espacial**

### **12.3.1 La STZ produce deterioro de la memoria espacial a los 15 días**

Con el fin de valorar la memoria espacial en el grupo de 15 días se evaluó en la tarea de LAM, las latencias de escape del promedio del último ensayo vs la sesión de prueba de los grupos VEH y STZ. Se aplicó un ANOVA de dos vías y se encontraron diferencias significativas entre el factor grupo ( $F_{(1, 30)} = 6.16$ ;  $p = 0.01$ ), no se observaron diferencias entre sesiones ( $F_{(1, 30)} = 2.90$ ;  $p = 0.09$ ) y, estadísticamente existe una interacción entre los factores sesión y grupo ( $F_{(1, 30)} = 10.25$ ,  $p = 0.003$ ), mostrando en la prueba *post hoc* de Bonferroni/Dunn que las diferencias son entre los grupos VEH vs STZ ( $p = 0.01$ ) y, en el grupo STZ existen diferencias significativas entre sesiones ( $p = 0.004$ ), esto nos indica deterioro en la memoria espacial para el grupo STZ (Figura 9A).



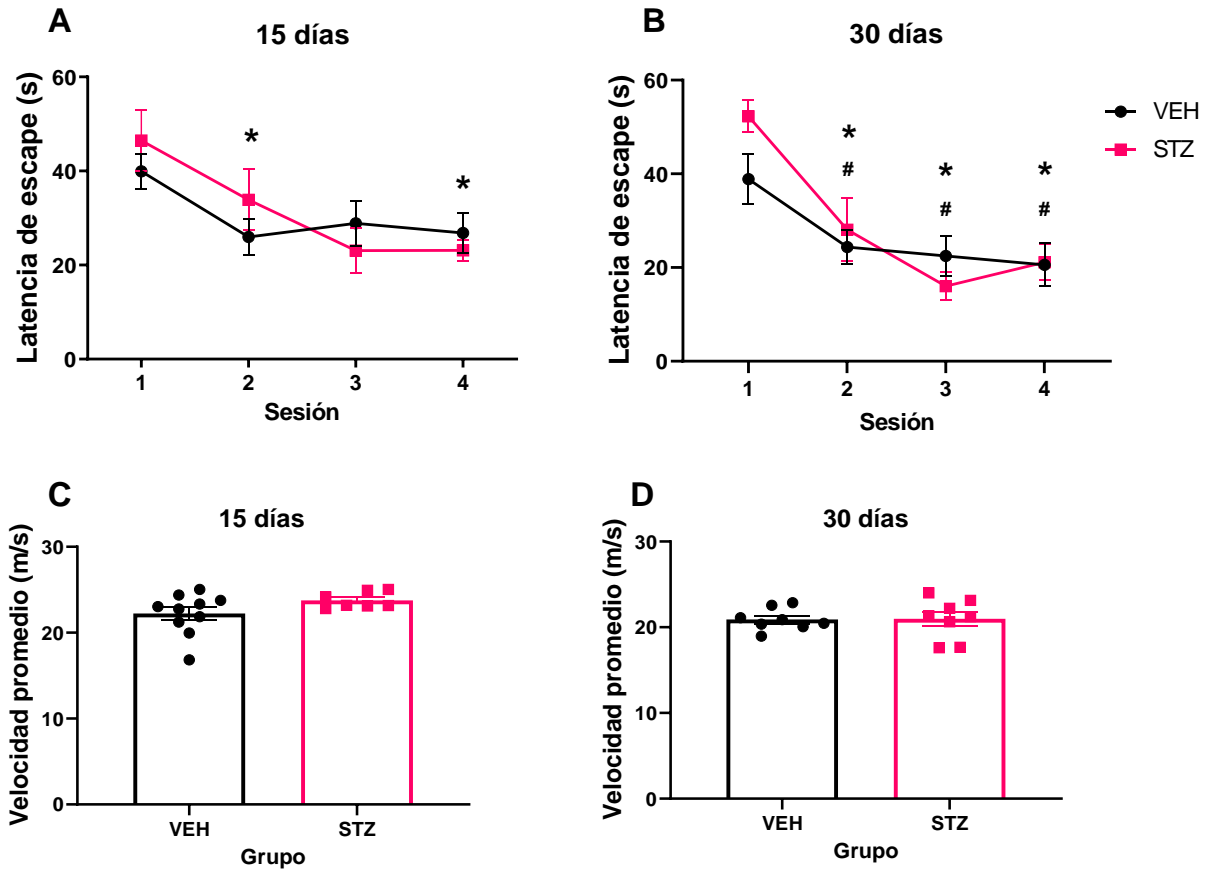


Figura 8. Se muestran la media con los errores estándar de las latencias de escape de la fase de entrenamiento del LAM la cual fue evaluada a los 15 (A) y 30 (B) días. Se observa una curva de aprendizaje estadísticamente significativa a los 15 días en el grupo VEH y, a los 30 días en los grupos VEH y STZ ( $p < 0.05$ ). Se muestran las velocidades promedio (m/s) con los errores estándar obtenidos durante la fase de entrenamiento del LAM a los 15 (C) y 30 (D) días en los grupos VEH y STZ, no existen diferencias significativas ( $p > 0.05$ ). \* $p < 0.05$  del ensayo 1 para el grupo VEH, # $p < 0.05$  del ensayo 1 para el grupo STZ.  $n = 7-10$  por grupo.

Además, se evaluó el número de entradas entre el cuadrante objetivo vs el cuadrante opuesto en la sesión de retención de los grupos VEH y STZ. Se aplicó un ANOVA de dos vías y no se encontraron diferencias significativas entre el factor grupo ( $F_{(1, 30)} = 2.68$ ;  $p = 0.11$ ), aunque si se observaron diferencias entre cuadrantes ( $F_{(1, 30)} = 4.37$ ;  $p = 0.04$ ) pero no existió una interacción entre los factores cuadrante y grupo ( $F_{(1, 30)} = 0.49$ ;  $p = 0.48$ ), mostrando en la prueba *post hoc* de Bonferroni/Dunn que las diferencias son para el grupo VEH entre el cuadrante objetivo vs el cuadrante opuesto ( $p = 0.03$ ), al no haber diferencias para el grupo STZ ( $p = 0.41$ ) esto nos indica deterioro en la memoria espacial para el grupo STZ (Figura 9B).

También, se evaluó la velocidad promedio durante la sesión de retención de los grupos VEH y STZ. Se aplicó un ANOVA de dos vías y no se encontraron diferencias significativas entre el factor grupo ( $F_{(1, 30)} = 2.02$ ;  $p = 0.16$ ), no se observaron diferencias entre cuadrantes ( $F_{(1, 30)} = 0.029$ ;  $p = 0.86$ ) y, tampoco una interacción entre los factores cuadrante y grupo ( $F_{(1, 30)} = 0.002$ ;  $p = 0.96$ ), esto nos indica que no existen diferencias en la velocidad promedio entre los grupos estudiados (Figura 9C).

Aparte, se evaluó el tiempo de permanencia entre el cuadrante objetivo vs el cuadrante opuesto en la sesión de retención de los grupos VEH y STZ. Se aplicó un ANOVA de dos vías y no se encontraron diferencias significativas entre el factor grupo ( $F_{(1, 30)} = 0.20$ ;  $p = 0.65$ ), no se observaron diferencias entre cuadrantes ( $F_{(1, 30)} = 0.11$ ;  $p = 0.73$ ) y, tampoco una interacción entre los factores cuadrante y grupo ( $F_{(1, 30)} = 0.30$ ;  $p = 0.58$ ) (Figura 9D).

Asimismo, se evaluó la distancia total recorrida durante la sesión de retención de los grupos VEH y STZ, se aplicó una t-student no pareada y no se encontraron diferencias significativas entre grupos ( $t_{(15)} = 1.42$ ,  $p = 0.17$ . Figura 9E) sin embargo, al evaluar con una t-student no pareada la distancia recorrida hasta el lugar de la plataforma durante la sesión de retención de los grupos VEH y STZ, se encontraron diferencias significativas entre grupos ( $t_{(15)} = 2.17$ ,  $p = 0.045$ ), indicando que el grupo VEH recorrió una menor distancia para llegar al lugar de la plataforma comparado con el grupo STZ (Figura 9F) y, al no encontrar la plataforma continuaron explorando el tanque, por eso no hay diferencias entre grupos al evaluar la distancia total recorrida.

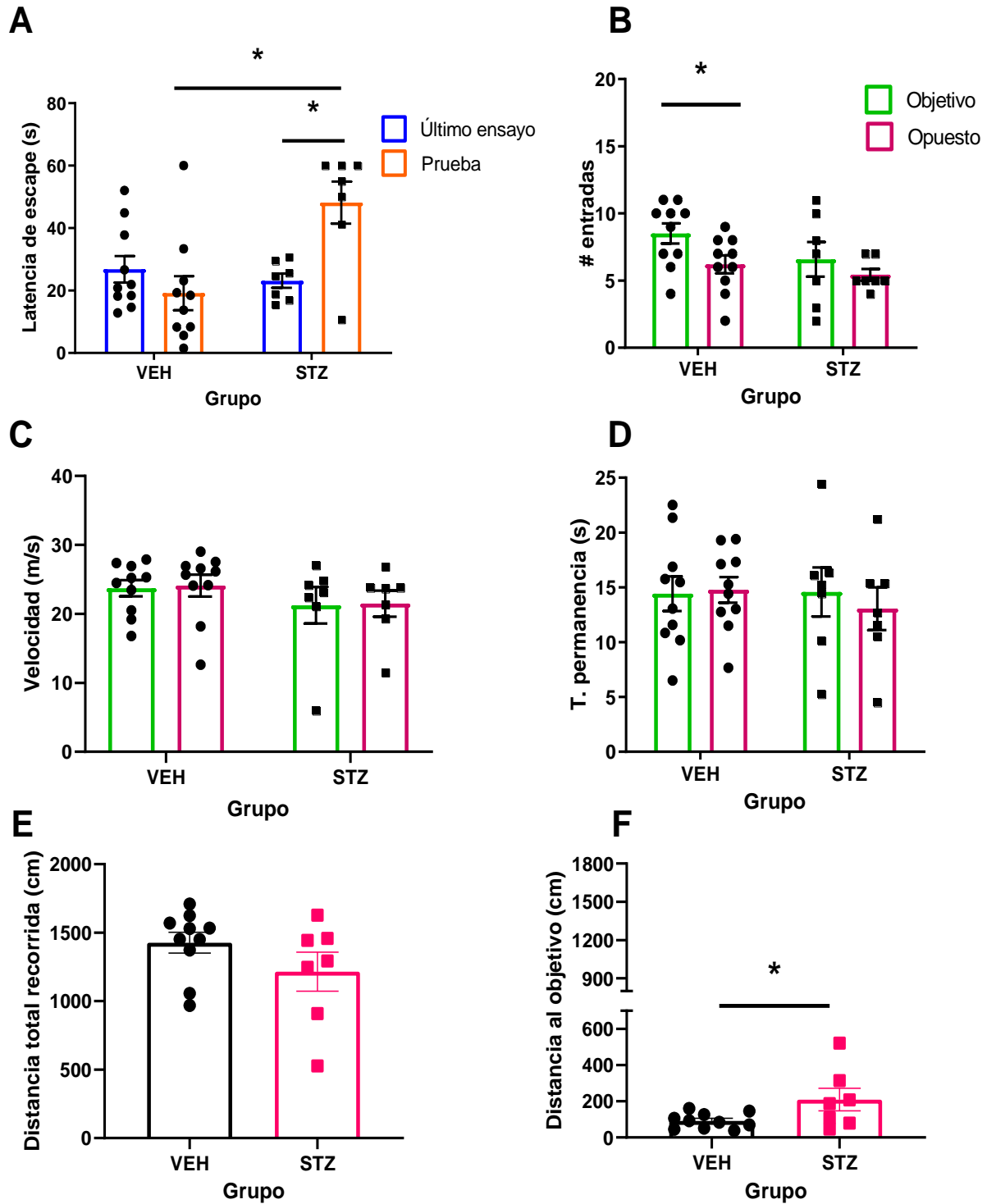


Figura 9. Se muestra la media y el error estándar de las diversas evaluaciones realizadas en la prueba de retención del LAM a los 15 días postquirúrgicos en los grupos VEH y STZ. A) Latencia de escape (s), B) Número de entradas al cuadrante, C) Velocidad promedio (m/s), D) Tiempo de permanencia en el cuadrante (s), E) Distancia total recorrida (cm), F) Distancia al objetivo (cm). \* $p < 0.05$ .  $n = 7-10$  por grupo.

### 12.3.2 La STZ produce deterioro de la memoria espacial a los 30 días

Con el fin de valorar la memoria espacial en el grupo de 30 días se evaluó en la tarea de LAM, las latencias de escape del promedio del último ensayo vs la sesión de prueba de los grupos VEH y STZ. Se aplicó un ANOVA de dos vías y no se encontraron diferencias significativas entre el factor grupo ( $F_{(1, 28)} = 0.03$ ;  $p = 0.86$ ), pero si se observaron diferencias entre sesiones ( $F_{(1, 28)} = 10.69$ ;  $p = 0.002$ ) y, tampoco se encontró interacción entre los factores sesión y grupo ( $F_{(1, 28)} = 0.90$ ,  $p = 0.34$ ), mostrando en la prueba *post hoc* de Bonferroni/Dunn que las diferencias son para el grupo STZ entre la sesión de entrenamiento vs prueba ( $p = 0.01$ ), esto nos indica deterioro en la memoria espacial para el grupo STZ (Figura 10A).

Además, se evaluó el número de entradas entre el cuadrante objetivo vs el cuadrante opuesto en la sesión de retención de los grupos VEH y STZ. Se aplicó un ANOVA de dos vías y no se encontraron diferencias significativas entre el factor grupo ( $F_{(1, 28)} = 1.60$ ;  $p = 0.21$ ), pero se observaron diferencias entre cuadrantes ( $F_{(1, 28)} = 4.84$ ;  $p = 0.03$ ) y no existió una interacción entre los factores cuadrante y grupo ( $F_{(1, 28)} = 0.21$ ;  $p = 0.64$ ), mostrando en la prueba *post hoc* de Bonferroni/Dunn que las diferencias son para el grupo VEH entre el cuadrante objetivo vs el cuadrante opuesto ( $p = 0.01$ ), al no haber diferencias para el grupo STZ ( $p = 0.33$ ) esto nos indica deterioro en la memoria espacial para el grupo STZ (Figura 10B).

También, se evaluó la velocidad promedio durante la sesión de retención de los grupos VEH y STZ. Se aplicó un ANOVA de dos vías y no se encontraron diferencias significativas entre el factor grupo ( $F_{(1, 28)} = 0.21$ ;  $p = 0.65$ ), no se observaron diferencias entre cuadrantes ( $F_{(1, 28)} = 1.67$ ;  $p = 0.20$ ) y, tampoco una interacción entre los factores cuadrante y grupo ( $F_{(1, 28)} = 0.34$ ;  $p = 0.56$ ), esto nos indica que no existen diferencias en la velocidad promedio entre los grupos estudiados (Figura 10C).

Aparte, se evaluó el tiempo de permanencia entre el cuadrante objetivo vs el cuadrante opuesto en la sesión de retención de los grupos VEH y STZ. Se aplicó un ANOVA de dos vías y no se encontraron diferencias significativas entre el factor grupo ( $F_{(1, 28)} = 1.92$ ;  $p = 0.17$ ), no se observaron diferencias entre cuadrantes ( $F_{(1, 28)} = 0.06$ ;  $p = 0.80$ ) y, tampoco una interacción entre los factores cuadrante y grupo ( $F_{(1, 28)} = 0.40$ ;  $p = 0.53$ ) (Figura 10D).

Asimismo, se evaluó la distancia total recorrida durante la sesión de retención de los grupos VEH y STZ, se aplicó una t-student no pareada y no se encontraron diferencias significativas entre grupos ( $t_{(14)} = 0.56$ ,  $p = 0.58$ , Figura 10E). Al evaluar con una t-student no pareada la distancia recorrida hasta el lugar de la plataforma durante la sesión de retención de los grupos VEH y STZ, no se encontraron diferencias significativas entre grupos ( $t_{(14)} = 1.90$ ,  $p = 0.07$ , Figura 10F).

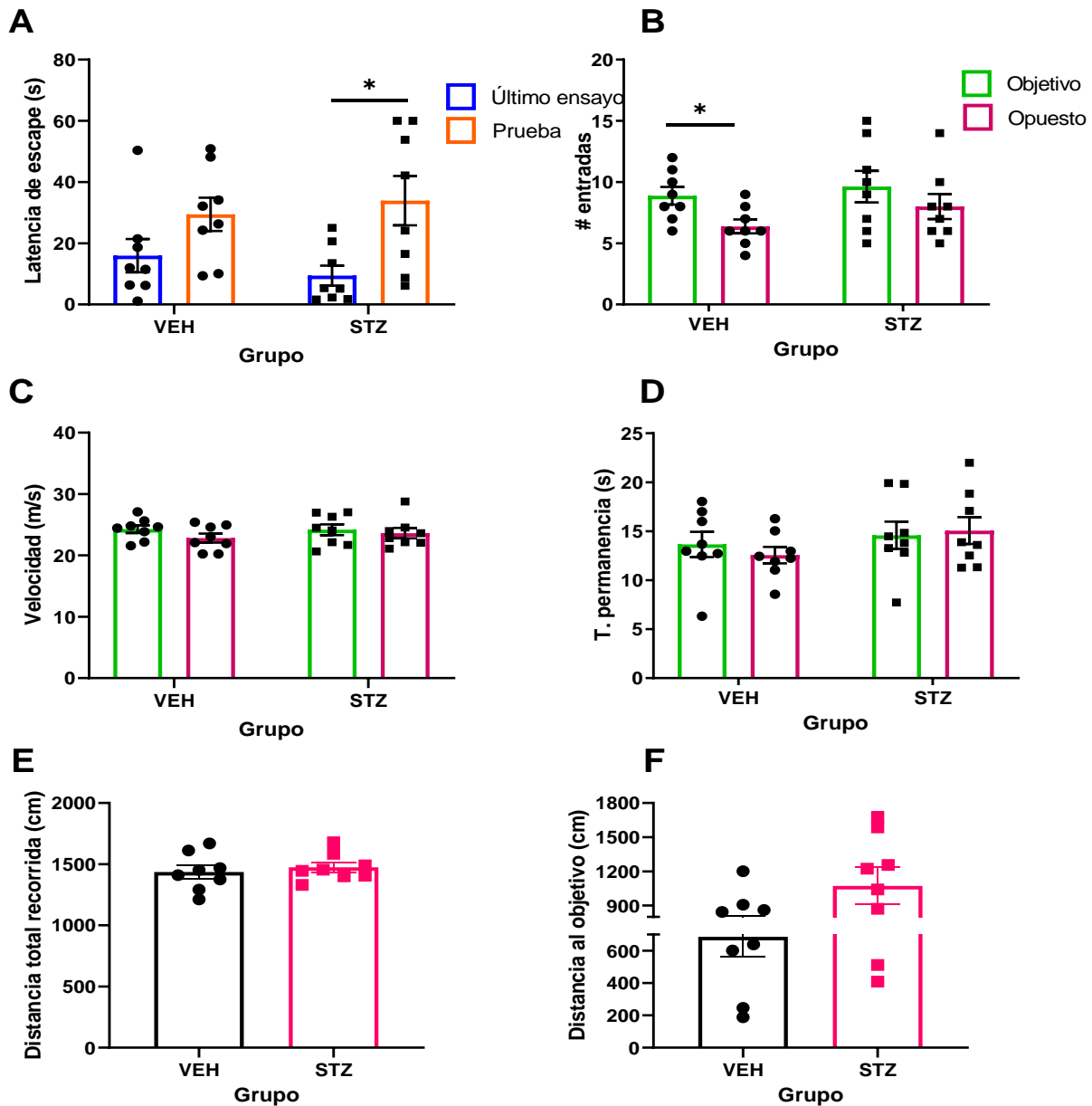


Figura 10. Se muestra la media y el error estándar de las evaluaciones realizadas en la prueba de retención del LAM a los 30 días postquirúrgicos en los grupos VEH y STZ. A) Latencia de escape (s), B) Número de entradas al cuadrante, C) Velocidad promedio (m/s), E) Tiempo de permanencia en el cuadrante (s), D) Distancia total recorrida (cm), E) Distancia al objetivo (cm). \* $p < 0.05$ .  $n = 8-10$  por grupo.

## 12.4 Efecto de la STZ sobre el péptido $\beta$ A

### 12.4.1 El péptido $\beta$ A está presente a los 15 y 30 días en el grupo STZ

Se observaron las imágenes obtenidas del péptido  $\beta$ A 1-42 por medio de microscopía de fluorescencia. El péptido  $\beta$ A 1-42 no estuvo presente en el grupo VEH (Figura 11A). Se observó la presencia del péptido  $\beta$ A 1-42 en el grupo STZ, tanto a los 15 (Figura 11B) como a los 30 días (Figura 11C). Se utilizó una ratona 3xTg de 10 meses de edad como control positivo, en la cual se tomó una fotografía de la región con mayor intensidad de señal presente (CA3-CP, Figura 11D).

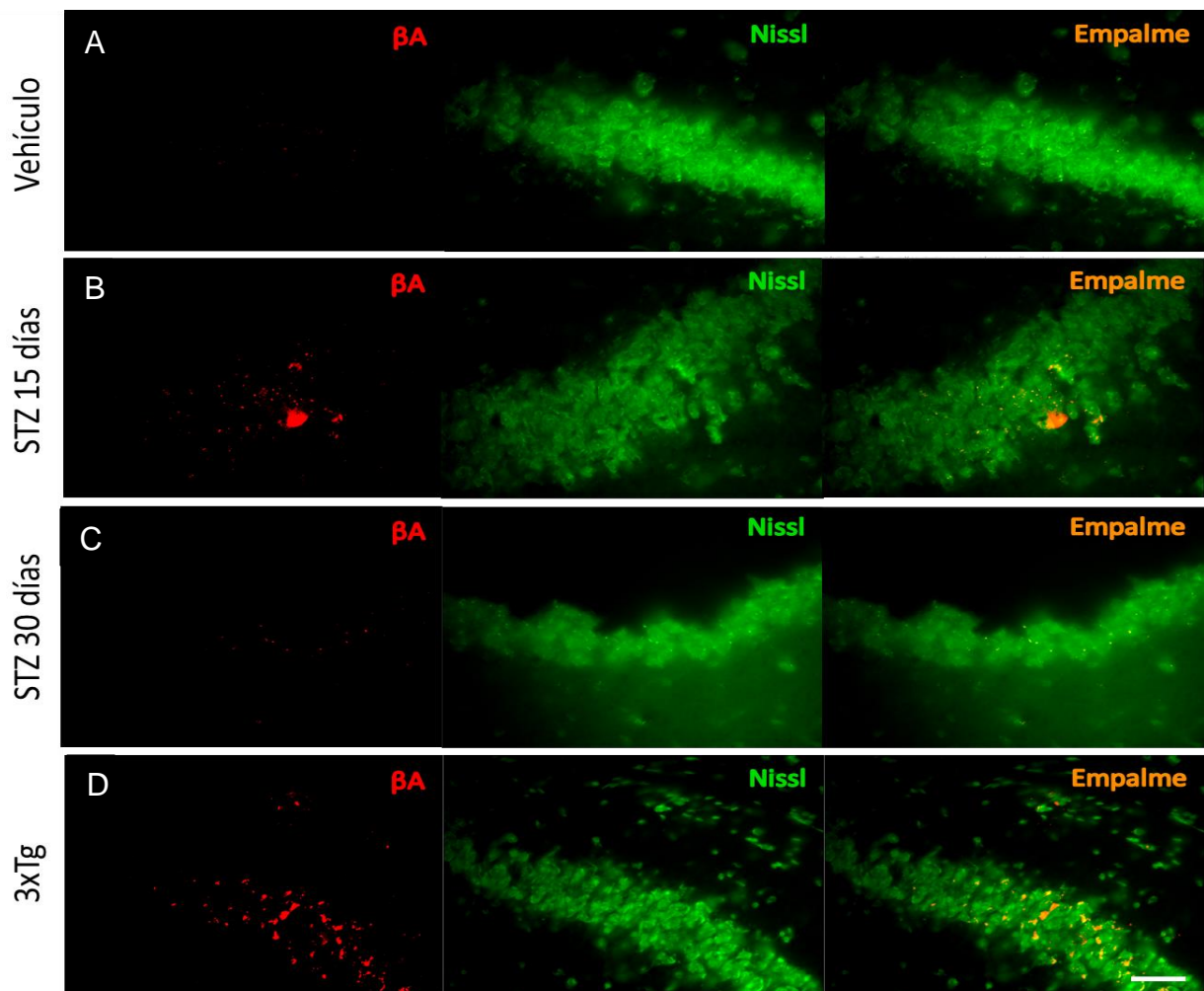


Figura 11. Imágenes representativas de la región de CA3 de la capa piramidal (CA3-CP) tomadas por microscopía de fluorescencia para el péptido  $\beta$ A 1-42 en el grupo vehículo (A), el grupo STZ 15 días (B), el grupo STZ 30 días (C) y un 3xTg (D) utilizado como control positivo. En rojo es la señal del péptido  $\beta$ A 1-42 y en verde la señal con el Nissl fluorescente. La barra representa 50  $\mu$ m.

## 12.5 Efecto de la STZ sobre el RI

### 12.5.1 La STZ disminuye los niveles del RI a los 15 días

Para el grupo de 15 días, el análisis de la DOR evaluó el promedio de la intensidad de la expresión del receptor de insulina en función del área de cada región de interés dentro del hipocampo y mostró diferencias significativas entre los grupos VEH y STZ solo en dos regiones del hipocampo: la región del CA1-Oriens ( $t_{(6)} = 2.47$ ,  $p = 0.048$ , Figura 12A) y el CA1-CP ( $t_{(6)} = 2.51$ ,  $p = 0.045$ , Figura 12B). No se encontraron diferencias significativas entre los grupos VEH y STZ para las siguientes regiones: CA1-Radiatum ( $t_{(6)} = 1.84$ ,  $p = 0.11$ , Figura 12C), CA3-Oriens ( $t_{(6)} = 0.71$ ,  $p = 0.50$ , Figura 12D), CA3-CP ( $t_{(6)} = 0.19$ ,  $p = 0.85$ , Figura 12E), CA3-Lucidum ( $t_{(6)} = 0.08$ ,  $p = 0.93$ , Figura 12F), GD ( $t_{(6)} = 1.16$ ,  $p = 0.28$ , Figura 12G) y GD-LM ( $t_{(6)} = 1.23$ ,  $p = 0.26$ , Figura 12H).

En la figura 13 se pueden observar las imágenes representativas de los resultados descritos de las inmunofluorescencias del receptor de insulina realizadas tanto para el grupo VEH como para el grupo STZ para el periodo de los 15 días, utilizando Nissl fluorescente como contratinción.

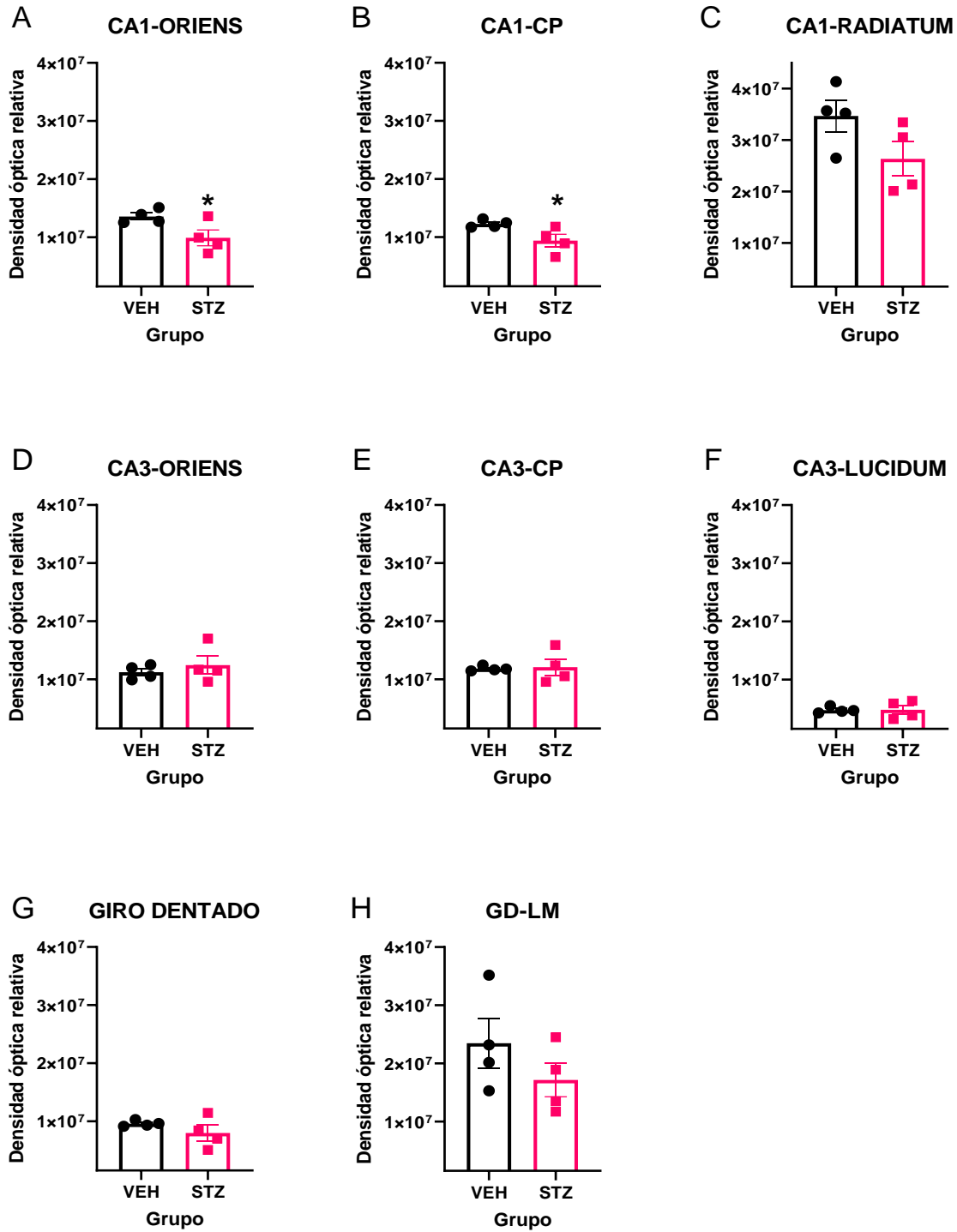


Figura 12. Se muestra el promedio y el error estándar de la densidad óptica relativa del receptor de insulina en las regiones de interés dentro del hipocampo en los grupos VEH y STZ a los 15 días postquirúrgicos. Subdivisiones de CA1: A) el *stratum oriens* (CA1-Oriens), B) la capa piramidal (CA1-CP) y C) el *stratum radiatum* (CA1-Radiatum). Subdivisiones de CA3: D) el *stratum oriens* (CA3-Oriens), E) la capa piramidal (CA3-CP) y F) el *stratum lucidum* (CA3-Lucidum). El G) giro dentado (GD) se subdividió en H) el *stratum lacunosum moleculare* (GD-LM). \* $p < 0.05$ .  $n = 4-5$  por grupo.



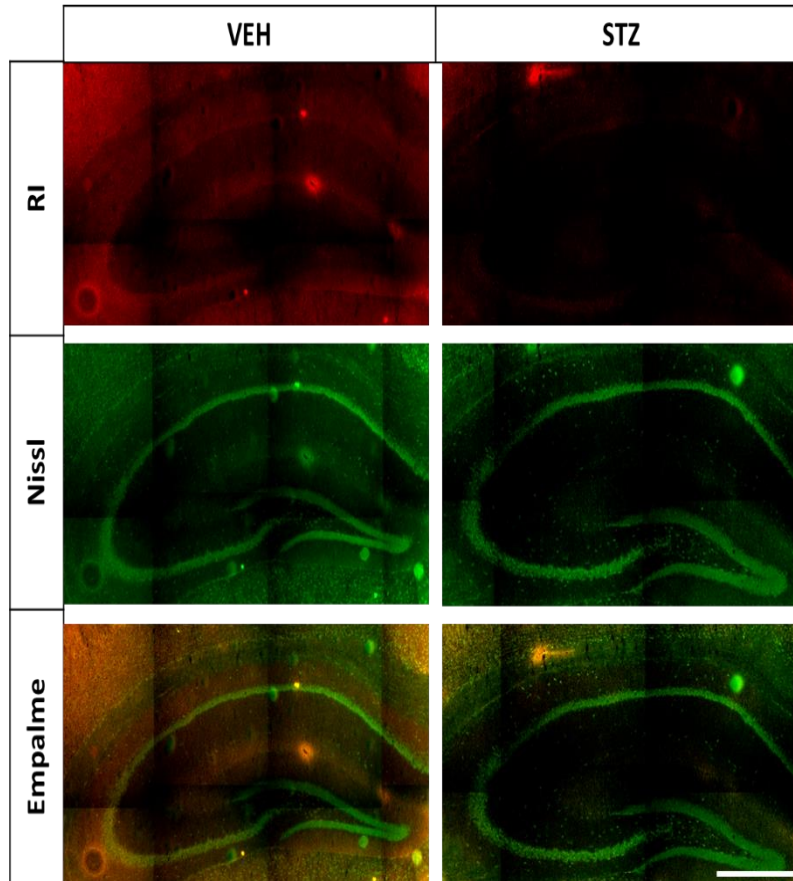


Figura 13. Imágenes representativas de la región del hipocampo dorsal tomadas por microscopia de fluorescencia para el receptor de insulina (RI) en el grupo VEH y en el grupo STZ a los 15 días posteriores a la cirugía estereotáxica. La barra representa 500  $\mu\text{m}$ . VEH: Vehículo, STZ: Estreptozotocina.

### 12.5.2 La STZ no modifica los niveles del RI a los 30 días

Para el grupo de 30 días, el análisis de la DOR que evaluó el promedio de la intensidad de la expresión del receptor de insulina en función del área de cada región de interés dentro del hipocampo no mostró diferencias significativas entre los grupos VEH y STZ en las siguientes regiones del hipocampo: CA1-Oriens ( $t_{(6)} = 0.37$ ,  $p = 0.72$ , Figura 14A), CA1-CP ( $t_{(6)} = 0.005$ ,  $p = 0.99$ , Figura 14B), CA1-Radiatum ( $t_{(6)} = 0.31$ ,  $p = 0.76$ , Figura 14C), CA3-Oriens ( $t_{(6)} = 0.60$ ,  $p = 0.56$ , Figura 14D), CA3-CP ( $t_{(6)} = 1.41$ ,  $p = 0.20$ , Figura 14E), CA3-Lucidum ( $t_{(6)} = 1.39$ ,  $p = 0.21$ , Figura 14F), GD ( $t_{(6)} = 0.49$ ,  $p = 0.63$ , Figura 14G) y GD-LM ( $t_{(6)} = 0.41$ ,  $p = 0.69$ , Figura 14H).

En la figura 15 se pueden observar las imágenes representativas de los resultados descritos de las inmunofluorescencias del receptor de insulina realizadas tanto para el grupo VEH como para el grupo STZ para el periodo de los 30 días, utilizando Nissl fluorescente como contratinción.

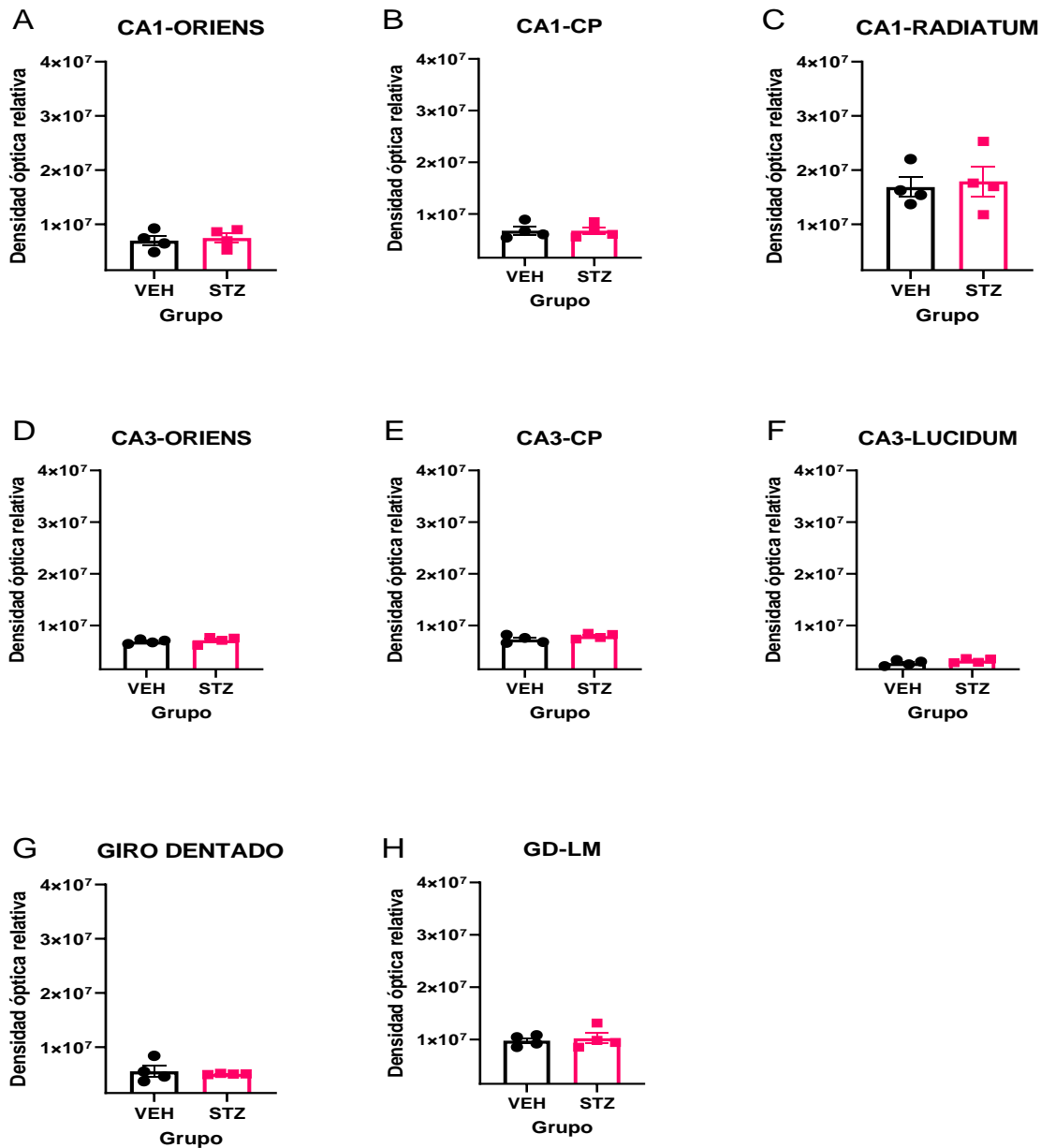


Figura 14. Se muestra la media y el error estándar de la densidad óptica relativa del receptor de insulina en las regiones de interés dentro del hipocampo en los grupos VEH y STZ a los 30 días postquirúrgicos. Subdivisiones de CA1: A) el *stratum oriens* (CA1-Oriens), B) la capa piramidal (CA1-CP) y C) el *stratum radiatum* (CA1-Radiatum). Subdivisiones de CA3: D) el *stratum oriens* (CA3-Oriens), E) la capa piramidal (CA3-CP) y F) el *stratum lucidum* (CA3-Lucidum). El G) giro dentado (GD) se subdividió en H) el *stratum lacunosum molecular* (GD-LM). n = 4-5 por grupo

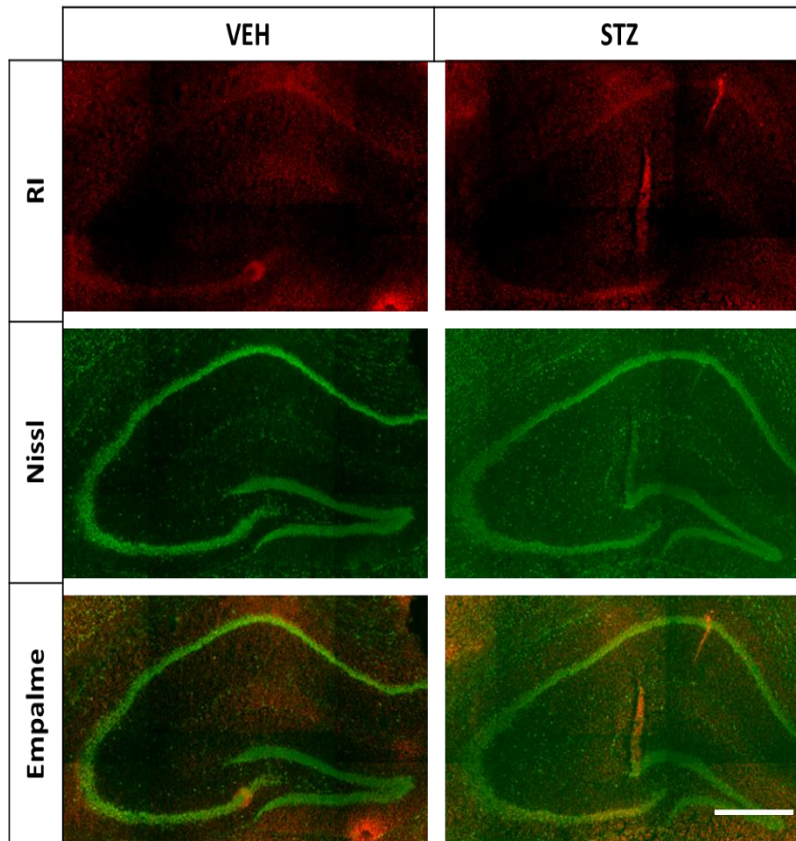


Figura 15. Imágenes representativas de la región del hipocampo dorsal tomadas por microscopia de fluorescencia para el receptor de insulina (RI) en el grupo VEH y en el grupo STZ a los 30 días posteriores a la cirugía estereotáxica. La barra representa 500  $\mu\text{m}$ . VEH: Vehículo, STZ: Estreptozotocina.

## 12.6 Efecto de la STZ sobre el pSRI-1 (Ser307)

### 12.6.1 La STZ no modifica los niveles del pSRI-1 (Ser307) a los 15 días

Para el grupo de 15 días, el análisis de la DOR que evaluó el promedio de la intensidad de la expresión del pSRI-1 (Ser307) en función del área de cada región de interés dentro del hipocampo no mostró diferencias significativas entre los grupos VEH y STZ en las siguientes regiones del hipocampo: CA1-Oriens ( $t_{(7)} = 0.49$ ,  $p = 0.63$ , Figura 16A), CA1-CP ( $t_{(7)} = 1.07$ ,  $p = 0.31$ , Figura 16B), CA1-Radiatum ( $t_{(7)} = 0.49$ ,  $p = 0.63$ , Figura 16C), CA3-Oriens ( $t_{(7)} = 0.41$ ,  $p = 0.69$ , Figura 16D), CA3-CP ( $t_{(7)} = 0.48$ ,  $p = 0.64$ , Figura 16E), CA3-Lucidum ( $t_{(7)} = 0.09$ ,  $p = 0.92$ , Figura 16F), GD ( $t_{(7)} = 1.35$ ,  $p = 0.21$ , Figura 16G) y GD-LM ( $t_{(7)} = 0.70$ ,  $p = 0.50$ , Figura 16H).

En la figura 17 se observan las imágenes representativas de los resultados descritos de las inmunofluorescencias del pSRI-1 (Ser307) realizadas tanto para el grupo VEH como para el grupo STZ para el periodo de los 15 días, utilizando Nissl fluorescente como contraindicación.

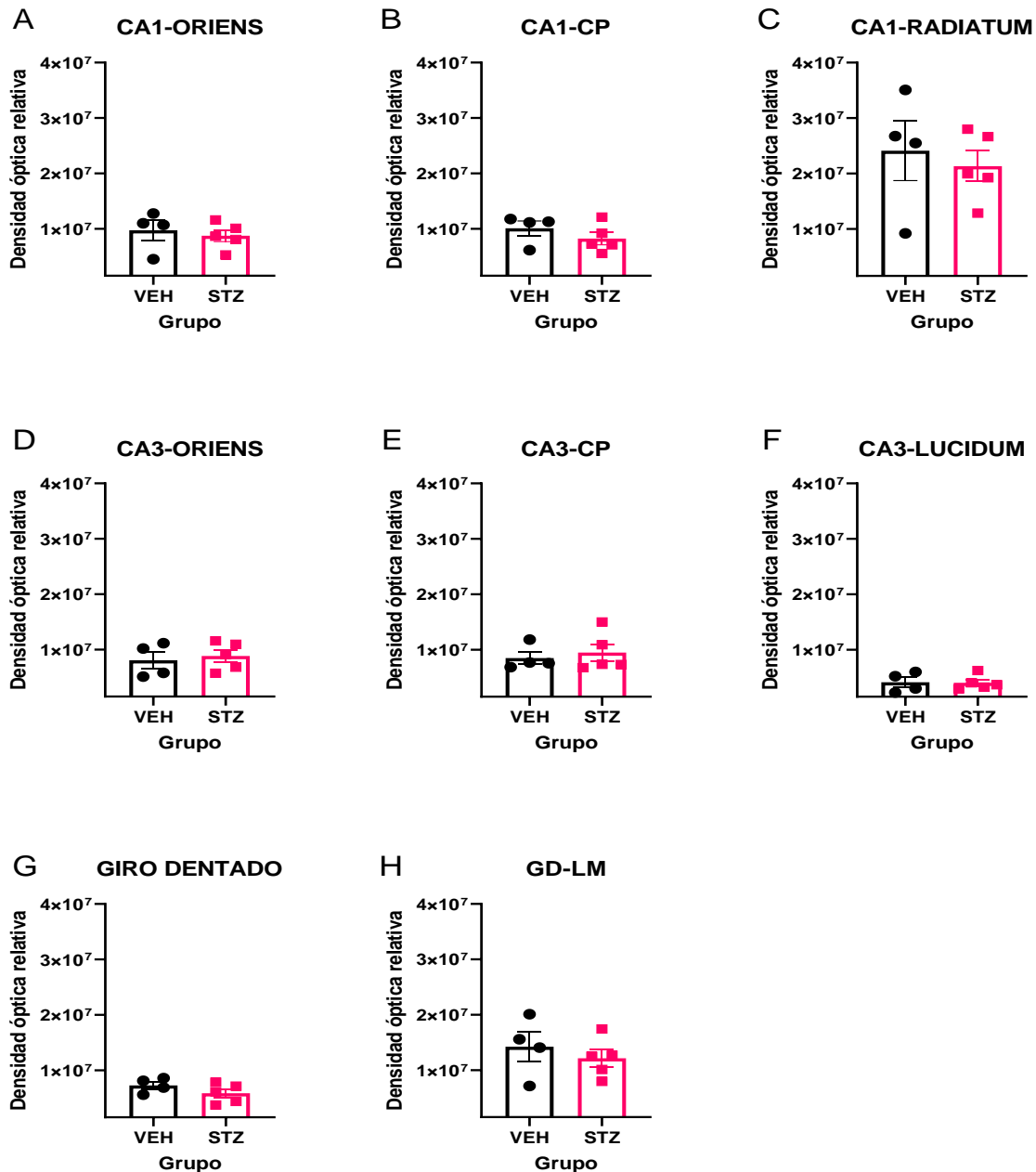


Figura 66. Se muestra la media y el error estándar de la densidad óptica relativa del pSRI-1 (Ser307) en las regiones de interés dentro del hipocampo en los grupos VEH y STZ a los 15 días postquirúrgicos. Subdivisiones de CA1: A) el *stratum oriens* (CA1-Oriens), B) la capa piramidal (CA1-CP) y C) el *stratum radiatum* (CA1-Radiatum). Subdivisiones de CA3: D) el *stratum oriens* (CA3-Oriens), E) la capa piramidal (CA3-CP) y F) el *stratum lucidum* (CA3-Lucidum). El G) giro dentado (GD) se subdividió en H) el *stratum lacunosum moleculare* (GD-LM). n = 4-5 por grupo

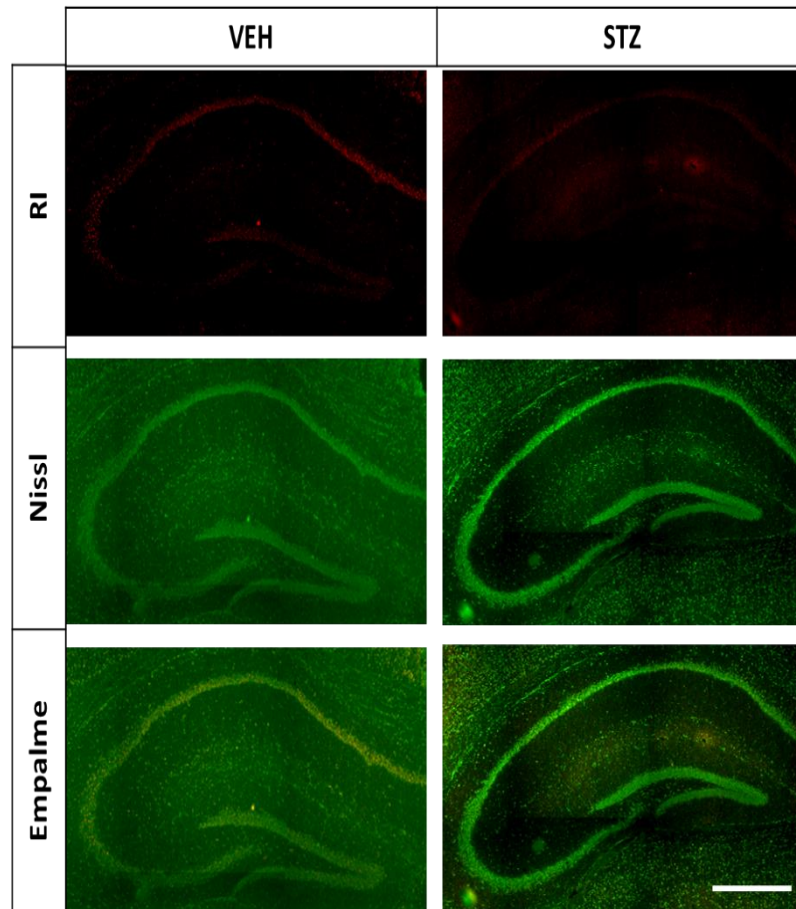


Figura 17. Imágenes representativas de la región del hipocampo dorsal tomadas por microscopia de fluorescencia para el pSRI-1 (Ser307) en el grupo VEH y en el grupo STZ a los 15 días posteriores a la cirugía estereotáxica. La barra representa 500  $\mu\text{m}$ . VEH: Vehículo, STZ: Estreptozotocina

### 12.6.2 La STZ no modifica los niveles del pSRI-1 (Ser307) a los 30 días

Para el grupo de 30 días, el análisis de la DOR evaluó el promedio de la intensidad de la expresión del pSRI-1 (Ser307) en función del área de cada región de interés dentro del hipocampo y no mostró diferencias significativas entre los grupos VEH y STZ en las siguientes regiones del hipocampo: CA1-Oriens ( $t_{(8)} = 0.36$ ,  $p = 0.72$ , Figura 18A), CA1-CP ( $t_{(8)} = 0.28$ ,  $p = 0.78$ , Figura 18B), CA1-Radiatum ( $t_{(8)} = 0.07$ ,  $p = 0.94$ , Figura 18C), CA3-Oriens ( $t_{(8)} = 0.02$ ,  $p = 0.98$ , Figura 18D), CA3-CP ( $t_{(8)} = 0.07$ ,  $p = 0.94$ , Figura 18E), CA3-Lucidum ( $t_{(8)} = 0.24$ ,  $p = 0.81$ , Figura 18F), GD ( $t_{(8)} = 1.05$ ,  $p = 0.32$ , Figura 18G) y GD-LM ( $t_{(8)} = 0.03$ ,  $p = 0.97$ , Figura 18H).

En la figura 19 se observan las imágenes representativas de los resultados descritos de las inmunofluorescencias del pSRI-1 (Ser307) realizadas tanto para el grupo VEH como para el grupo STZ para el periodo de los 30 días, utilizando Nissl fluorescente como contratinción.

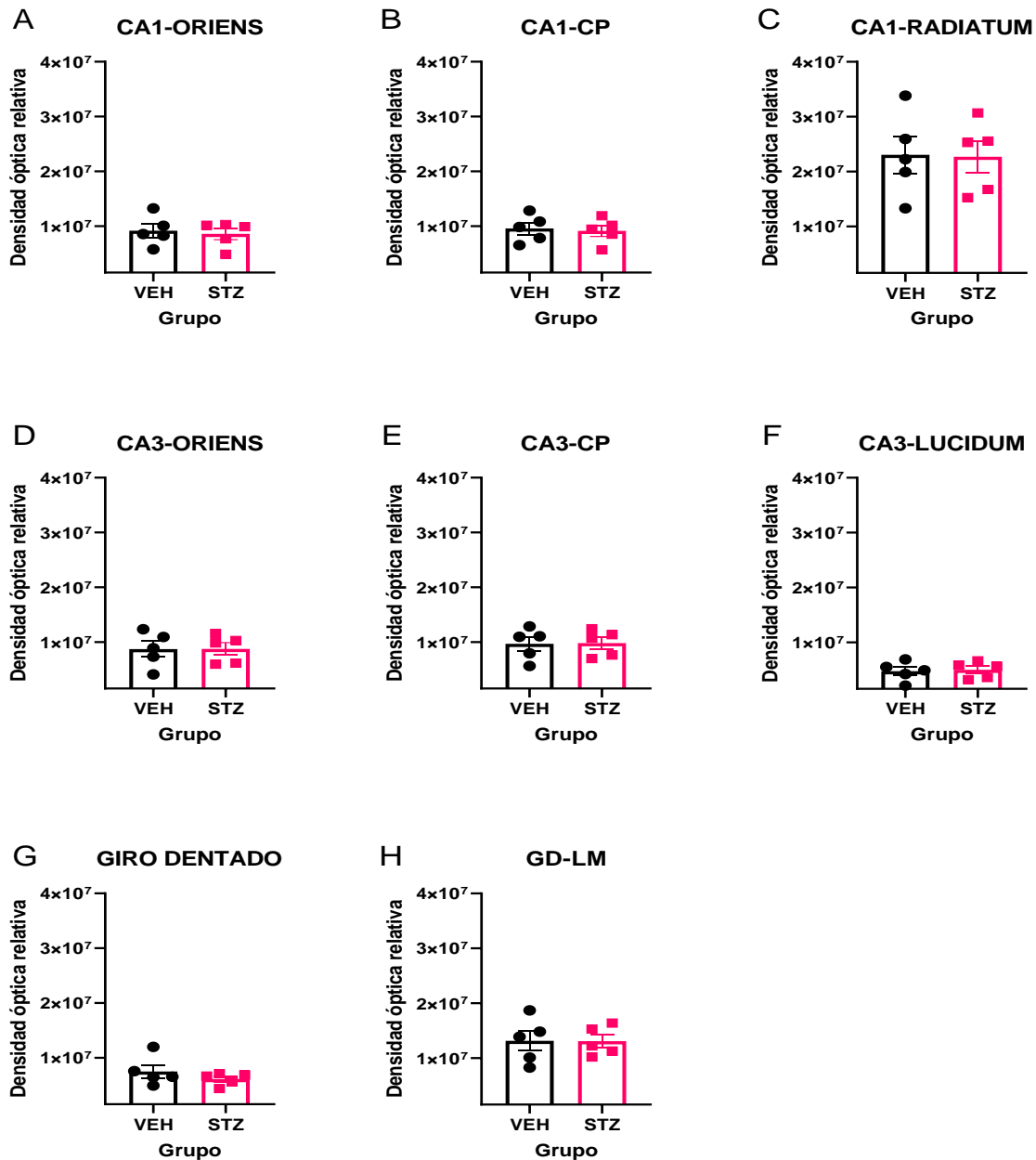


Figura 18. Se muestra la media y el error estándar de la densidad óptica relativa del pSRI-1 (Ser307) en las regiones de interés dentro del hipocampo en los grupos VEH y STZ a los 30 días postquirúrgicos. Subdivisiones de CA1: A) el *stratum oriens* (CA1-Oriens), B) la capa piramidal (CA1-CP) y C) el *stratum radiatum* (CA1-Radiatum). Subdivisiones de CA3: D) el *stratum oriens* (CA3-Oriens), E) la capa piramidal (CA3-CP) y F) el *stratum lucidum* (CA3-Lucidum). El G) giro dentado (GD) se subdividió en H) el *stratum lacunosum molecular* (GD-LM). n = 4-5 por grupo



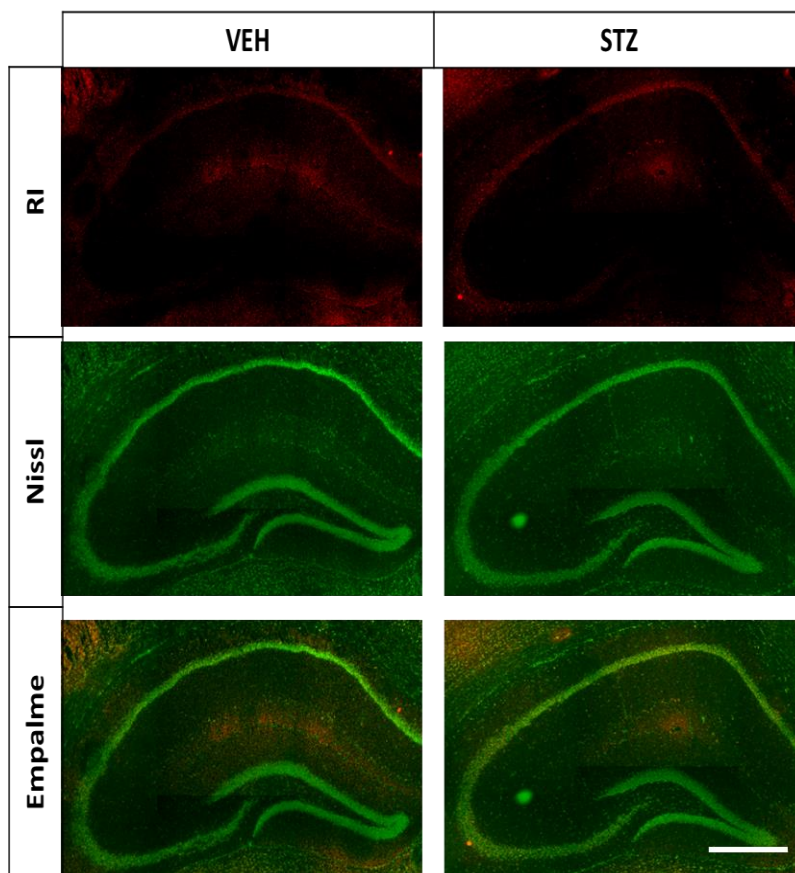


Figura 197. Imágenes representativas de la región del hipocampo dorsal tomadas por microscopia de fluorescencia para el pSRI-1 (Ser307) en el grupo VEH y en el grupo STZ a los 30 días posteriores a la cirugía estereotáxica. La barra representa 500  $\mu$ m. VEH: Vehículo, STZ: Estreptozotocina.

En la tabla 3 se muestra a modo de resumen los hallazgos conductuales e histológicos de ambos periodos de tiempo junto con sus respectivas hipótesis.

15 días	Variable	30 días
Sin cambios	Glucosa en sangre	Sin cambios
Deterioro	Aprendizaje espacial	Presente
Deterioro	Memoria espacial	Deterioro
Presente	Péptido $\beta$ A	Presente
Disminuido	Receptor de insulina	Sin cambios
Sin cambios	pSRI (Ser307)	Sin cambios

Tabla 3. Resumen de las variables conductuales e histológicas evaluadas a los 15 y 30 días. Las celdas color azul muestran las variables evaluadas, las celdas color verde muestran los resultados que cumplen las hipótesis alternas y las celdas color rojo los resultados que no cumplen las hipótesis propuestas.

### 13. DISCUSIÓN

En el presente trabajo demostramos cambios a nivel conductual e histológico en el modelo de neurodegeneración tipo EA esporádica producido por la administración icv de STZ en dos periodos de tiempo posteriores a su administración, 15 y 30 días. De manera general y en orden cronológico encontramos que: 1) Los niveles de glucosa en sangre no son modificados por la STZ icv, 2) Esta afectada la curva de aprendizaje espacial a los 15 días después de la administración icv de STZ; no así en los animales con STZ icv evaluados a los 30 días, 3) Existe deterioro en la memoria espacial en los animales con STZ icv tanto a los 15 como a los 30 días posteriores a su administración, 4) A nivel histológico, a los 15 días después de haber aplicado la STZ icv hubo una disminución del receptor de insulina en las regiones hipocampales del CA1-Oriens y del CA1-CP, mientras que a los 30 días después de aplicar la STZ icv este efecto ya no se observó, 5) En el modelo de neurodegeneración tipo EA esporádica producido por la administración icv de STZ en ratones macho CD1 no existieron cambios significativos en la fosforilación del SRI-1 (Ser307) ni a los 15 ni a los 30 días posteriores a la inducción del modelo.

Primero, se debe hacer mención a la complejidad del manejo de la STZ porque es un fármaco utilizado tanto para desarrollar el modelo de DT1, así como para servir de modelo para la EA. Los estudios diseñados con este fármaco presentan un rango de variabilidad en cuanto a los resultados encontrados ya que no existe un protocolo estándar para su preparación, dosificación ni administración. En nuestro caso, se propició un modelo de neurodegeneración tipo EA esporádica que presentó características similares a las descritas en la patología con STZ icv con una dosis de 3 mg/kg en ratones macho CD1 de 10 semanas de edad y la mortalidad fue del 7% contrario a los resultados reportados por Chen et al., (2014) y Nakhate et al., (2018), en donde fue del 10 al 30%. Estas diferencias podrían ser explicadas porque la mortalidad encontrada en la literatura corresponde a ratones de diversas cepas (albino Swiss y 3xTg) y no existe reporte de este dato en el ratón CD1 con STZ icv.



### 13.1 De la toxicidad de la STZ

Es importante mencionar el concepto de toxicidad de la STZ y su dependencia con la edad así como el de recuperación natural del organismo ante la STZ, ya que se ha mencionado que el modelo de neurodegeneración tipo EA por STZ icv presenta la ventaja de poder replicarse de la misma manera independientemente de la edad de aplicación de la STZ pero la evidencia demuestra lo contrario cuando se utiliza como modelo de DT1, donde existe una correlación directamente proporcional entre la mortalidad y la edad (Wang-Fischer y Garyantes, 2018). Una posible respuesta, podría ser la distinta vía de administración de la STZ (intraperitoneal vs icv) y que la dosis utilizada es menor (30-100 mg/kg vs 3 mg/kg), lo cual podría conferir las ventajas ya mencionadas del modelo de neurodegeneración tipo EA sin embargo, por los resultados encontrados y que se discuten más adelante, también podríamos tener efectos por toxicidad y de recuperación.

Es importante tener en cuenta el alcance toxico de la STZ. Este fármaco pertenece al grupo de las nitrosaminas como, la N-nitrosodimetilamina y la N-nitrosodietilamina, compuestos encontrados en el tabaco para mascar, embutidos, cerveza, pescado, quesos, champú, aire interior de los automóviles, entre otros (National center for biotechnology information, 2021b, 2021a). Se sabe que la exposición prolongada o dosis altas de la nitrosodietilamina causa mutagénesis y muerte celular, mientras que dosis bajas y limitadas se consideran sub-mutagénicas y promueven la resistencia a la insulina, desencadenando con el tiempo enfermedades crónico-degenerativas como la EA, la DT2 o la esteatosis hepática (De la Monte y Tong, 2014). Por otro lado, se reconoce que la unión de la STZ con el GLUT2 promueve la apoptosis celular (A. Knezovic et al., 2017), pero poco se sabe de la cadena de eventos intracelulares por la cual este fármaco ejerce su efecto. Si trasladamos el funcionamiento de otras nitrosaminas a la STZ, nos encontramos ante la posibilidad de la alquilación del DNA, de la producción de especies reactivas de oxígeno, de la peroxidación de lípidos y de la activación de citocinas pro-inflamatorias como TNF- $\alpha$  (De la Monte y Tong, 2014), lo cual influiría en la fosforilación anormal del SRI-1 y sus cinasas dependientes, desencadenando la resistencia a la insulina y eventualmente la diabetes tipo 3. Aunque esta es una hipótesis para tener en cuenta, en este proyecto la STZ icv se administró en dosis limitada y baja (3 mg/kg), lo

cual imita la hipótesis de la nitrosodietilamina sobre la resistencia a la insulina, no de la muerte celular.

### **13.2 De la glucosa sanguínea**

En este trabajo se demostró que tanto a los 15 y 30 días posteriores a la administración de STZ icv no existió un cambio significativo en los niveles de glucosa en sangre. Estos resultados son acordes a la hipótesis propuesta, sustentada por otros autores como Correia et al., (2013) y Zhang et al., (2018), los cuales señalan tanto en ratones de 8 y 12 semanas de edad como en ratas Wistar de 3 meses de edad, que la administración icv de STZ a dosis sub-diabéticas (3 mg/kg) no produce alteraciones en la glucosa sistémica, ya que la STZ no cruza la barrera hematoencefálica. Para la medición de los niveles de glucosa en sangre los animales no se mantuvieron en ayuno ya que el propósito de esta evaluación se realizó con el fin de ser un punto de control para indicarnos que efectivamente la STZ permaneció solo icv y no llegó a la circulación sistémica, más que darnos un estatus sobre el metabolismo de la glucosa o indirectamente de la insulina sistémica (Ayala et al., 2010).

Aunque bien se argumenta que un ayuno de 5-6 horas puede tomarse como fisiológico en el ratón y condiciona a tener niveles basales de glucosa, lo cual haría la medición menos variable, también es cierto que la medición de la glucosa llega a tener mayor variabilidad dependiendo de la hora del día en que se tome la muestra por los cambios en el ciclo circadiano, del lugar de la toma de la muestra, de las diferencias inter experimentador e incluso de la utilización de diferentes aparatos de medición (Ayala et al., 2010; Sun et al., 2016). Además, fisiológicamente los ratones a diferencia de los humanos tienen un patrón de alimentación diferente, ya que consumen 2/3 de su alimento durante su fase de actividad y el resto en su fase de descanso, por lo cual el ponerlos en ayuno podría estresarlos, propiciar la liberación de corticosterona y modificar los niveles de glucosa (Jensen et al., 2013). Por estas razones en este proyecto tuvo mayor relevancia la constancia sobre la variable de la hora de la toma de la muestra, el sitio de toma de la muestra, la toma de la muestra por el mismo usuario y el manejo del mismo dispositivo de medición en todos los animales evaluados.

### 13.3 Del aprendizaje espacial

La STZ tiene un efecto sobre el aprendizaje espacial de los animales. Se demostró que en la tarea del LAM la STZ impidió la curva de aprendizaje a los 15 días, no ocurriendo este efecto a los 30 días posteriores a la administración de STZ icv. La primera parte de la oración anterior concuerda con las hipótesis establecidas de autores como Ravelli et al., (2016), quienes han demostrado deterioro cognitivo a partir de los 14 días posteriores a la administración icv de STZ, así como Cui et al., (2018) y Sasaki-Hamada et al., (2019), quienes también han encontrado deterioro en la tarea del LAM a partir de los 15 días. Estas observaciones indican la facilidad con la cual la STZ icv puede ocasionar alteraciones hipocampales que se reflejan de forma conductual en un periodo tan corto de tiempo como lo son 15 días, no siendo posible en otros modelos para la EA, por ejemplo los modelos transgénicos como el 3xTg o el 5xFAD que necesitan 4 y 6 meses respectivamente para demostrar cambios conductuales (“Research Models”, s/f), confiriéndole una ventaja al modelo con STZ icv. Sin embargo, no se satisfizo la hipótesis propuesta para el periodo de 30 días en los ratones CD1 ya que se demostró una curva de aprendizaje, este hallazgo aunando a la carencia de una curva de aprendizaje a los 15 días podría estar explicado por una regresión de las alteraciones de los mecanismos de plasticidad que aún no han llegado a su estado basal, porque como lo estipula la teoría Hebbiana para que la información adquirida del ambiente pueda ser procesada necesita de la actividad eléctrica coordinada de los ensambles neuronales y que eventualmente estos ensambles se agrupen en circuitos recurrentes que permitan la reverberación de la actividad, lo cual permite el establecimiento de cambios en la eficiencia sináptica y en el establecimiento de patrones a corto y largo plazo para así formar una memoria (Carasatorre y Ramírez-Amaya, 2012). Es por esto que la posible existencia de una interferencia en el proceso de adquisición y consolidación en el modelo de STZ icv debido a los cambios acaecidos a nivel de la cascada de insulina y que se discuten más adelante podrían ser causa suficiente para que el modelo de STZ icv presente a los 15 días un impedimento tanto para la adquisición como para la consolidación, no ocurriendo esto en el grupo STZ icv a los 30 días puesto que se podría estar dando una recuperación. Aunque este punto de argumentación trata sobre la regresión del modelo a un estado basal, por otro lado y desde otra perspectiva consideremos que en la administración de

la STZ intraperitoneal con la que se induce el modelo de DT1 puede existir un estado de regresión de la hiperglucemia, de los niveles de insulina, así como una estabilización en el daño tisular pancreático comparado con niveles similares en animales controles (Wang-Fischer y Garyantes, 2018) esto no significa que el efecto de la STZ o de la DT1 sufrieron una regresión, ya que continua desarrollándose el daño neuropático y la aparición de cataratas, sino que la enfermedad ha sido modificada. De la misma manera en el modelo de STZ icv en ratas macho Wistar Knezovic et al., (2015), encontraron un periodo de recuperación en la tarea de LAM, el cual fue de 30 a 60 días posteriores a la administración del fármaco sin embargo, el aumento del depósito del péptido  $\beta$ A y de la fosforilación de tau continuó en el tiempo. Recordemos que tratamos con modelos animales y pueden no semejar en su totalidad la enfermedad encontrada en el ser humano, por lo que el hallazgo de la presencia de una curva de aprendizaje en los animales a los 30 días después de la STZ icv puede no ser sinónimo de desaparición de la enfermedad de la EA, sino de una modificación de esta. En este punto también podemos discutir los hallazgos de la velocidad promedio evaluada durante la tarea del LAM, en el cual no hubo diferencias entre el grupo VEH y el STZ ni a los 15 ni a los 30 días y esto concuerda con las hipótesis propuestas, sustentadas en la literatura de autores como Chen et al., (2013) y Rostami et al., (2017), que explican por medio de la prueba del rotarod que no existen deficiencias motoras en los animales. Por lo cual, el deterioro en la memoria de nuestro modelo constatado por: el aumento en la latencia de escape, la disminución en el número de cruces al cuadrante objetivo y mayor distancia recorrida encontrado en los animales con STZ en el LAM no es debido a problemas motores.

#### **13.4 De la memoria espacial**

La tarea del laberinto acuático de Morris es un paradigma conductual que evalúa la memoria espacial (Vorhees y Williams, 2006), en este proyecto encontramos que tanto a los 15 como a los 30 días hubo deterioro en la memoria espacial en los animales con STZ icv, lo cual concuerda con las hipótesis postuladas ya que diversos autores como Chen et al., (2013;), Cui et al., (2018) y Sasaki-Hamada et al., (2019), han evidenciado el detrimento en la memoria espacial en estos dos periodos de tiempo.

El deterioro cognitivo progresivo es un criterio fundamental que debe de estar presente para considerar una demencia (McKhann GM, 2011), por lo que el deterioro en la memoria encontrado con la STZ icv sostiene fundamentalmente al modelo como una neurodegeneración tipo EA. En el ser humano este deterioro se describe como una alteración de la memoria declarativa en la cual el hipocampo se ve involucrado (Holtzman et al., 2011). Trasladando este hallazgo al modelo murino se tiene una alteración de la memoria espacial en la cual se ve involucrada la región del hipocampo dorsal (Vorhees y Williams, 2014). Integrando la totalidad de los datos encontrados por el LAM tenemos que en el grupo de STZ icv a los 15 días posteriores a su inyección, existió una disfunción en el proceso de adquisición y consolidación, pero en el grupo de STZ icv a los 30 días posteriores a su inyección solo existió deterioro en la consolidación, no en la adquisición.

Además, se reconoce que las memorias continúan siendo dinámicas después de la consolidación, lo que implica que en la evocación se abren ventanas en las cuales las memorias son susceptibles de modificación y que puede resultar en su degradación, estabilización o reforzamiento (Herszage y Censor, 2018). En este aspecto existen dos conceptos que llaman la atención: interferencia y generalización, el primero definido como una competencia por la síntesis de proteínas entre dos memorias con diferentes ensambles neuronales que son activados a la par, o dentro de un corto espacio de tiempo resultando en la disminución del desempeño de una tarea; mientras que el segundo se define como, la transferencia de una memoria hacia otra memoria que se activó al mismo tiempo, resultando en el aumento de la eficacia por el fortalecimiento de los ensambles neuronales (Herszage y Censor, 2018). Aunado a esto, se reconoce en la EA una disfunción sináptica que se traduce conductualmente como una interferencia o una disfunción en la generalización, ya que los pacientes presentan una menor habilidad para generalizar memorias (Bódi et al., 2009). Entonces, trasladando estos conceptos a los hallazgos de este proyecto, existe la posibilidad que en el grupo STZ durante la sesión de prueba a) existiera otra memoria que interfiera con lo ya aprendido y se reflejó como un deterioro en la memoria o, b) los animales tienen características similares a la EA, por lo cual no pudieron generalizar la tarea de esa sesión (nadar 60s en el tanque intentando encontrar la plataforma en el cuadrante designado) dado que ellos ya tenían una curva de aprendizaje y les tomaba menor tiempo nadar hacia la plataforma. Con esta

información se deduce que el deterioro en la memoria encontrado en los animales con STZ podría deberse a una interferencia en la evocación o al deterioro en la generalización impidiendo un adecuado desempeño al evocar la tarea.

### 13.5 Del RI

La insulina y el RI han sido implicados en el proceso del aprendizaje y la memoria a nivel hipocampal y se postulan como un mecanismo por el cual se promueve la plasticidad sináptica al estimular la expresión de receptores glutamatérgicos en la membrana celular (Soto et al., 2019).

Con respecto a los resultados encontrados para el RI en las regiones de CA1-*oriens* y CA1-CP, se satisface la hipótesis de una disminución del RI a nivel del CA1 para el grupo STZ 15 días. Sin embargo, al no haber encontrado cambios en la región del CA3 del grupo STZ 15 días ni en el grupo STZ 30 días tanto en la región del CA1 como del CA3, se acepta la hipótesis nula para estos casos. Autores como Stanley et al., (2016), señalan en seres humanos la implicación de diversas regiones hipocampales como, el CA1, el CA3 y el GD con la regulación a la baja de los RI en la demencia de Alzheimer. En el modelo de STZ icv se ha demostrado la disminución de los RI en regiones como el CA1 y el CA3 (Zappa Villar et al., 2018) sin embargo, no se ha dilucidado por estratos. En este trabajo demostramos que existe una disminución de RI en la región del CA1-CP y CA1-*oriens* en el grupo STZ 15 días. Previamente Gupta et al., (2018) y Zappa Villar et al., (2018), demostraron una disminución neuronal de la capa piramidal del CA1, aunado a una disminución del árbol dendrítico en este modelo. Autores como Zhao et al., (1999) reportaron en ratones wild-type que después del entrenamiento en el LAM se aprecia en la región del CA1 una redistribución y aumento del mRNA y de la proteína del RI a nivel de las dendritas y del núcleo, pero De Felice et al., (2009) demostró por cultivos neuronales expuestos a la STZ una disminución de los RI a nivel de las dendritas neuronales hipocampales. Entonces, bajo este contexto podría ser que nos encontremos ante dos posibilidades: existe una pérdida neuronal a nivel del CA1-CP que consecuentemente condicionaría la pérdida de los RI o, la STZ ocasiona una regulación a la baja de los RI que en este caso se reflejó tanto en el CA1-CP como en CA1-*oriens*.

Se sabe que el hipocampo dorsal es una región con predisposición a la vulnerabilidad neuronal porque en experimentos con modelos murinos de hipoxia-isquemia que culminan con hipometabolismo celular, la región CA1 es la primera en verse afectada con la muerte neuronal de la CP (Schmidt-Kastner, 2015). Además, se sabe que la EA presenta un hipometabolismo celular que inicia en el hipocampo y que con el paso del tiempo se generaliza a la corteza temporal (L. Mosconi et al., 2005; L Mosconi et al., 2008). Entonces existe la posibilidad que en el modelo STZ icv la afectación de la CP y del *stratum oriens* a los 15 días este dado por ser un modelo de neurodegeneración tipo Alzheimer que imite los cambios de hipometabolismo celular y, por la vulnerabilidad neuronal intrínseca del CA1 que permitió dilucidar cambios neuronales tempranos con la STZ icv.

Respecto al grupo de STZ 30 días, el no haber encontrado cambios en el RI se podría deber, como se comentó previamente, a una recuperación de los mecanismos de plasticidad sináptica en este periodo de tiempo.

Retomando el diseño publicado acerca de inyectar intrahipocampalmente lentivirus anti-RI y donde se redujo la expresión de los RI hasta en un 70% a los 21 días (Grillo et al., 2015), se podría especular que en nuestro modelo la disminución de la expresión de los RI en el grupo STZ 15 días fue del 70% o más, lo suficiente para producir deterioro en el aprendizaje y la memoria espacial pero en el grupo STZ 30 días al no haber cambios en el RI comparado con el grupo VEH, pudo haber una recuperación de los mecanismos de plasticidad sináptica y por ende, la expresión de los RI sería mayor del 30%, lo cual se reflejó de manera conductual por una curva de aprendizaje significativa pero un pobre desempeño durante la sesión de prueba del LAM, hallazgos que concuerdan con lo descrito por Grillo et al., (2015) al haber evaluado a sus animales 4 semanas después de la inyección de los lentivirus.

### **13.6 Del péptido $\beta$ A**

En cuanto a los resultados del péptido  $\beta$ A 1-42, de manera cualitativa lo encontramos presente en la región del CA3, tanto a los 15 como a los 30 días en el grupo STZ, este

resultado concuerda con las hipótesis propuestas de algunos autores como Ravelli et al., (2016), quien ha descrito cuantitativamente su presencia.

El péptido  $\beta$ A se reconoce como el factor principal de la hipótesis de la cascada  $\beta$ A y se describe a su fracción 1-42 como una de las involucradas en la EA (Cline et al., 2018) por lo cual, efectivamente este es un modelo que puede simular la EA por la aparición del péptido  $\beta$ A, el cual es un factor necesario para poder valorar la presencia o ausencia de la enfermedad.

Por otra parte, se han descrito diversos mecanismos por los cuales el péptido  $\beta$ A influye sobre la cascada de insulina y se asocia con la teoría de la diabetes tipo 3, por ejemplo: 1) el argumento acerca de que el péptido  $\beta$ A puede ser eliminado gracias a la EDI, que como su nombre lo indica degrada a la insulina, al presentar mayor afinidad hacia la insulina, aunque ante un estado de resistencia a la insulina la EDI promueve en mayor medida la degradación de la insulina mientras permea la acumulación del péptido  $\beta$ A (Kochkina et al., 2015). Adicionalmente, la EDI se encuentra disminuida en la resistencia a la insulina probablemente por una menor estabilidad de la enzima o un aumento en su degradación (Osmanovic Barilar et al., 2014). 2) Se plantea la teoría intra y extracelular ya propuesta Liao y Xu, (2015), en la cual se relaciona la presencia de péptido  $\beta$ A intracelular y/o de los oligómeros extracelulares como factores que pueden impedir el adecuado funcionamiento del receptor de insulina y su cascada río abajo, la teoría extracelular lo propone por medio de la unión de los oligómeros del péptido  $\beta$ A a las dendritas en cultivos neuronales, mientras que la teoría intracelular propone al péptido  $\beta$ A intracelular como interruptor de la asociación entre PDK y Akt, evitando su activación. 3) Se conoce que ante la presencia del péptido  $\beta$ A se produce interferencia sináptica y endocitosis de las subunidades de los receptores glutamatérgicos NMDA y AMPA, la internalización de estos receptores da como resultado un impedimento para la potenciación a largo plazo y la memoria. Aunque los mecanismos subyacentes de esta relación aun no son vislumbrados, algunos autores (Grillo et al., 2015) proponen que la insulina y su cascada facilitan la plasticidad sináptica al promover la expresión de los receptores NMDA y AMPA, por eso los modelos animales con resistencia a la insulina hipocampal presentan alteraciones en la memoria.



Con respecto a la región hipocampal CA3, esta es conocida por formar parte del circuito trisináptico y por su arquitectura anatómica que permite la modificación sináptica asociativa a nivel local y la activación recurrente y esporádica, por consiguiente, se propone como un área en la que la información multimodal puede ser procesada, almacenada y eventualmente evocada a partir de entradas parciales (Daumas, 2005). Por lo mencionado previamente, la presencia del péptido  $\beta$ A a este nivel interferiría con la fisiología sináptica de esta región.

Entonces, integrando los hallazgos histológicos del grupo STZ de 15 días (disminución de los RI en CA1 y presencia del péptido  $\beta$ A en CA3), se infiere que el péptido  $\beta$ A y la disminución de los RI podrían tener cabida como factores que contribuyeron a la falta de una curva de aprendizaje y al deterioro en la memoria espacial para este periodo de tiempo, ya que posiblemente y de acuerdo con reportes previos (Grillo et al., 2015) los RI y el péptido  $\beta$ A disminuyen la cantidad de receptores glutamatérgicos a nivel membranal y por ende la potenciación a largo plazo y la plasticidad sináptica; mientras que en el grupo STZ de 30 días al estar presente el péptido  $\beta$ A pero sin haber cambios en el RI, podría haber una recuperación de los mecanismos de plasticidad sináptica, por eso los animales solo presentaron deterioro en la memoria y no en la curva de aprendizaje.

No se debe pasar por alto el hecho que solo se analizó cualitativamente una región hipocampal, la que se apreció con mayor intensidad de señal en el animal utilizado como control positivo (3xTg), tendrían que considerarse mediciones cuantitativas y en las diferentes regiones hipocampales para tener estimaciones más precisas sobre el comportamiento del péptido  $\beta$ A y su incursión en este modelo.

### **13.7 Del pSRI (Ser307)**

Referente a los resultados obtenidos del pSRI-1 (Ser 307), en ambos grupos STZ de 15 y 30 días no encontramos modificación alguna en el pSRI-1 (Ser 307) comparados con el grupo VEH. Este hallazgo no satisface las hipótesis propuestas, ya que por otros estudios (Hançer et al., 2014; Kapogiannis et al., 2015) se han encontrado elevaciones

de este residuo (Ser 307) en el hipocampo de pacientes con la EA y se esperaba que nuestro modelo pudiera realmente imitar la EA en la evaluación de este residuo.

Sin embargo, la razón por la cual no encontramos modificación en este residuo podría deberse a que en los reportes previos el análisis fue realizado por medio de Western blot de la totalidad del hipocampo, mientras que en este proyecto el análisis se realizó por inmunofluorescencia dividiendo las regiones hipocampales y subdividiendo por estratos, por lo cual la variación en la técnica y el análisis podría llevarnos a resultados diferentes al compararlo con la suma total de sus partes y por eso encontramos resultados estadísticamente no significativos. Además, el realizar la evaluación de proteínas por medio de inmunofluorescencia es complejo dado que no hay una fuente definitiva de información de la distribución de proteínas en tejidos y compartimentos subcelulares, por lo cual el enfoque con la técnica de Western blot o inmunoblot suele ser utilizado para la evaluación de proteínas fosforiladas, además que en una misma membrana puede también ser evaluada la proteína total y por ende obtener la proporción proteína fosforilada/total (Lund y Browning, 2017). El propósito de este proyecto fue el apoyo a la caracterización del modelo de STZ icv por técnicas que permitieran describir y mantener la integridad del tejido para su análisis, por eso solo reportamos la evaluación a nivel de las regiones hipocampales ya mencionadas y sus correspondientes estratos. Sin embargo, no se descarta el uso de Western blot para una evaluación complementaria. No excluimos la posibilidad que en este modelo exista un aumento en la fracción total del SRI-1 como ya ha sido reportado (Chen et al., 2013) en otras cepas con STZ icv o que en el ratón CD1 con STZ icv exista el incremento de otros residuos de serina involucrados con un estado de resistencia a la insulina aunado a deterioro en la memoria, como son los residuos: Ser612, Ser632 y Ser1097 (Wang et al., 2019).

### **13.8 Limitaciones y perspectivas**

Las limitaciones radican en que se evaluó la memoria espacial durante un corto periodo de tiempo (15 y 30 días después de la administración de STZ), la estimación del péptido  $\beta$ A fue cualitativa y únicamente se evaluó la fosforilación de un residuo de serina del SRI-1.

Como una extensión de ese proyecto se propone la evaluación del modelo por 6 meses para conocer si los cambios encontrados en la memoria espacial, así como en el hipocampo perduran, se modifican a la alza o el modelo revierte su condición. También, se propone cuantificar el péptido  $\beta$ A en las distintas regiones hipocampales, estudiar los diversos componentes involucrados en la vía de señalización de la insulina relacionados con la resistencia a la insulina y la plasticidad sináptica en el hipocampo dorsal, como Akt y distintos residuos de serina (Ser612, Ser, 632, Ser1097) del SRI-1, así como las subunidades de los receptores glutamatérgicos (NMDA y AMPA), por su relación con la memoria.

#### 14. CONCLUSIONES

El modelo de neurodegeneración tipo EA esporádica por STZ icv mostró deterioro transitorio de la memoria espacial sin involucrar hiperglucemia sistémica. Nuestros datos sugieren que el fallo en la memoria espacial observado a los 15 días es dependiente del RI a nivel del CA1-CP y del CA1-*oriens*, así como del péptido  $\beta$ A en CA3, mientras que el deterioro en la memoria encontrado a los 30 días solo es dependiente del péptido  $\beta$ A.

#### 15. BIBLIOGRAFÍA

- Abner, E. L., Nelson, P. T., Kryscio, R. J., Schmitt, F. A., Fardo, D. W., Woltjer, R. L., ... Arvanitakis, Z. (2016). Diabetes is associated with cerebrovascular but not Alzheimer's disease neuropathology. *Alzheimer's & Dementia*, 12(8), 882–889. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2015.12.006>
- Alexander, G. E., Chen, K., Pietrini, P., Rapoport, S. I., & Reiman, E. M. (2002). Longitudinal PET evaluation of cerebral metabolic decline in dementia: A potential outcome measure in Alzheimer's disease treatment studies. *American Journal of Psychiatry*, 159(5), 738–745. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.159.5.738>
- American Psychiatric Association. (2013). Neurocognitive Disorders. En *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* (5a ed., pp. 271–279). Washington, D.C: American Psychiatric Association. <https://doi.org/10.1176/appi.books.9780890425596.dsm17>
- Arluison, M., Quignon, M., Nguyen, P., Thorens, B., Leloup, C., & Penicaud, L. (2004). Distribution and anatomical localization of the glucose transporter 2 (GLUT2) in the adult rat brain: an immunohistochemical study. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 28(3), 117–136. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2004.05.009>
- Arvanitakis, Z., Schneider, J. A., Wilson, R. S., Li, Y., Arnold, S. E., Wang, Z., & Bennett, D. A. (2006). Diabetes is related to cerebral infarction but not to AD pathology in older persons. *Neurology*, 67(11), 1960–1965.

- <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000247053.45483.4e>
- Ayala, J. E., Samuel, V. T., Morton, G. J., Obici, S., Croniger, C. M., Shulman, G. I., ... McGuinness, O. P. (2010). Standard operating procedures for describing and performing metabolic tests of glucose homeostasis in mice. *Disease Models & Mechanisms*, 3(9–10), 525–534. <https://doi.org/10.1242/dmm.006239>
- Baker, L. D., Cross, D. J., Minoshima, S., Belongia, D., Watson, G. S., & Craft, S. (2011). Insulin resistance and Alzheimer-like reductions in regional cerebral glucose metabolism for cognitively normal adults with prediabetes or early type 2 diabetes. *Archives of Neurology*, 68(1), 51–57. <https://doi.org/10.1001/archneurol.2010.225>
- Bankhead, P. (2016). *Analyzing fluorescence microscopy images with ImageJ*.
- Bello-Medina, P. C. (2011). *Las nuevas neuronas granulares del hipocampo en el procesamiento de información en la evocación de una memoria remota o reciente de reconocimiento de objetos*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Biasibetti, R., Almeida dos Santos, J. P., Rodrigues, L., Wartchow, K. M., Suardi, L. Z., Nardin, P., ... Gonçalves, C.-A. (2017). Hippocampal changes in STZ-model of Alzheimer's disease are dependent on sex. *Behavioural Brain Research*, 316, 205–214. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2016.08.057>
- Blázquez, E., Velázquez, E., Hurtado-Carneiro, V., & Ruiz-Albusac, J. M. (2014). Insulin in the brain: its pathophysiological implications for states related with central insulin resistance, type 2 diabetes and Alzheimer's disease. *Frontiers in Endocrinology*, 5, 1–21. <https://doi.org/10.3389/fendo.2014.00161>
- Bódi, N., Csibri, É., Myers, C. E., Gluck, M. A., & Kéri, S. (2009). Associative learning, acquired equivalence, and flexible generalization of knowledge in mild Alzheimer disease. *Cognitive and Behavioral Neurology*, 22(2), 89–94. <https://doi.org/10.1097/WNN.0b013e318192ccf0>
- Bomfim, T. R., Forny-Germano, L., Sathler, L. B., Brito-Moreira, J., Houzel, J. C., Decker, H., ... De Felice, F. G. (2012). An anti-diabetes agent protects the mouse brain from defective insulin signaling caused by Alzheimer's disease-associated A $\beta$  oligomers. *Journal of Clinical Investigation*, 122(4), 1339–1353. <https://doi.org/10.1172/JCI57256>
- Braidy, N., Muñoz, P., Palacios, A. G., Castellano-Gonzalez, G., Inestrosa, N. C., Chung, R. S., ... Guillemín, G. J. (2012). Recent rodent models for Alzheimer's disease: Clinical implications and basic research. *Journal of Neural Transmission*, 119(2), 173–195. <https://doi.org/10.1007/s00702-011-0731-5>
- Braskie, M. N., & Thompson, P. M. (2013). A focus on structural brain imaging in the Alzheimer's disease neuroimaging initiative. *Biological Psychiatry*, 75(7), 527–533. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2013.11.020>
- Broughton, S., & Partridge, L. (2009). Insulin/IGF-like signalling, the central nervous system and aging. *Biochemical Journal*, 418(1), 1–12. <https://doi.org/10.1042/BJ20082102>
- Burwell, R. D., & Agster, K. L. (2008). Anatomy of the hippocampus and the declarative memory system. En *Learning and Memory: A Comprehensive Reference* (pp. 47–66). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-012370509-9.00117-0>
- Carasatorre, M., Ochoa-Alvarez, A., Velázquez-Campos, G., Lozano-Flores, C., Díaz-Cintra, S. Y., & Ramírez-Amaya, V. (2015). Hippocampal synaptic expansion induced by spatial experience in rats correlates with improved information processing in the hippocampus. *PLOS ONE*, 10(8), e0132676.

- <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132676>
- Carasatorre, M., & Ramírez-Amaya, V. (2012). Network, cellular, and molecular mechanisms underlying long-term memory formation. En C. Belzung & P. Wigmore (Eds.), *Current Topics in Behavioral Neurosciences* (Vol. 15, pp. 73–115). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/7854\\_2012\\_229](https://doi.org/10.1007/7854_2012_229)
- Chen, G. F., Xu, T. H., Yan, Y., Zhou, Y. R., Jiang, Y., Melcher, K., & Xu, H. E. (2017). Amyloid beta: Structure, biology and structure-based therapeutic development. *Acta Pharmacologica Sinica*, 38(9), 1205–1235. <https://doi.org/10.1038/aps.2017.28>
- Chen, Y., Liang, Z., Blanchard, J., Dai, C.-L., Sun, S., Lee, M. H., ... Gong, C.-X. (2013). A non-transgenic mouse model (icv-STZ mouse) of Alzheimer's disease: Similarities to and differences from the transgenic model (3xTg-AD mouse). *Molecular Neurobiology*, 47(2), 711–725. <https://doi.org/10.1007/s12035-012-8375-5>
- Chen, Y., Liang, Z., Tian, Z., Blanchard, J., Dai, C., Chalbot, S., ... Gong, C.-X. (2014). Intracerebroventricular streptozotocin exacerbates Alzheimer-like changes of 3xTg-AD mice. *Molecular Neurobiology*, 49(1), 547–562. <https://doi.org/10.1007/s12035-013-8539-y>
- Chen, Z., & Zhong, C. (2013). Decoding Alzheimer's disease from perturbed cerebral glucose metabolism: Implications for diagnostic and therapeutic strategies. *Progress in Neurobiology*, 108, 21–43. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2013.06.004>
- Cheng, Z., Tseng, Y., & White, M. F. (2010). Insulin signaling meets mitochondria in metabolism. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 21(10), 589–598. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2010.06.005>
- Chornenkyy, Y., Wang, W., Wei, A., & Nelson, P. T. (2019). Alzheimer's disease and type 2 diabetes mellitus are distinct diseases with potential overlapping metabolic dysfunction upstream of observed cognitive decline. *Brain Pathology*, 29(1), 3–17. <https://doi.org/10.1111/bpa.12655>
- Cline, E. N., Bicca, M. A., Viola, K. L., & Klein, W. L. (2018). The amyloid- $\beta$  oligomer hypothesis: Beginning of the third decade. *Journal of Alzheimer's Disease*, 64(s1), 567–610. <https://doi.org/10.3233/JAD-179941>
- Copps, K. D., & White, M. F. (2012). Regulation of insulin sensitivity by serine/threonine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins IRS1 and IRS2. *Diabetologia*, 55, 2565–2582. <https://doi.org/10.1007/s00125-012-2644-8>
- Correia, S., Santos, R., Santos, M., Casadesus, G., LaManna, J., Perry, G., ... Moreira, P. (2013). Mitochondrial abnormalities in a streptozotocin-induced rat model of sporadic Alzheimer's disease. *Current Alzheimer Research*, 10(4), 406–419. <https://doi.org/10.2174/1567205011310040006>
- Cui, S., Song, J., Cui, X., Hu, X., Ma, Y., Shi, Y., ... Zhang, Y. (2018). Intracerebroventricular streptozotocin-induced Alzheimer's disease-like sleep disorders in rats: Role of the GABAergic system in the parabrachial complex. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 24(12), 1241–1252. <https://doi.org/10.1111/cns.13032>
- Daumas, S. (2005). Encoding, consolidation, and retrieval of contextual memory: Differential involvement of dorsal CA3 and CA1 hippocampal subregions. *Learning & Memory*, 12(4), 375–382. <https://doi.org/10.1101/lm.81905>
- De Felice, F. G., Lourenco, M. V., & Ferreira, S. T. (2014). How does brain insulin resistance develop in Alzheimer's disease? *Alzheimer's and Dementia*, 10, 26–32. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2013.12.004>
- De Felice, F. G., Vieira, M. N. N., Bomfim, T. R., Decker, H., Velasco, P. T., Lambert, M.

- P., ... Klein, W. L. (2009). Protection of synapses against Alzheimer's-linked toxins: Insulin signaling prevents the pathogenic binding of A $\beta$  oligomers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(6), 1971–1976. <https://doi.org/10.1073/pnas.0809158106>
- De la Monte, S. M., & Tong, M. (2014). Brain metabolic dysfunction at the core of Alzheimer's disease. *Biochemical Pharmacology*, 88(4), 548–559. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.12.012>
- de la Monte, S. M., & Wands, J. R. (2008). Alzheimer's disease is type 3 diabetes—evidence reviewed. *Journal of Diabetes Science and Technology*, 2(6), 1101–1113. <https://doi.org/10.1177/193229680800200619>
- DeVos, S. L., & Miller, T. M. (2013). Direct intraventricular delivery of drugs to the rodent central nervous system. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, 75(75), 1–10. <https://doi.org/10.3791/50326>
- Dubois, B., Feldman, H. H., Jacova, C., Hampel, H., Molinuevo, J. L., Blennow, K., ... Cummings, J. L. (2014). Advancing research diagnostic criteria for Alzheimer's disease: The IWG-2 criteria. *The Lancet Neurology*, 13(6), 614–629. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(14\)70090-0](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(14)70090-0)
- Dubois, B., Hampel, H., Feldman, H. H., Scheltens, P., Aisen, P., Andrieu, S., ... Jack, C. R. (2016). Preclinical Alzheimer's disease: Definition, natural history, and diagnostic criteria. *Alzheimer's & Dementia*, 12(3), 292–323. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2016.02.002>
- Executive Board. (2017). *Draft global action plan on the public health response to dementia: report by the director general*. World Health Organization.
- Ferrario, C. R., & Reagan, L. P. (2018). Insulin-mediated synaptic plasticity in the CNS: Anatomical, functional and temporal contexts. *Neuropharmacology*, 136, 182–191. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.12.001>
- Gaugler, J., James, B., Johnson, T., Scholz, K., & Weuve, J. (2016). 2016 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia*, 12(4), 459–509. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2016.03.001>
- Gómez-Padilla, E., Bello-Medina, P. C., León-Jacinto, U., Orta-Salazar, E., Quirarte, G. L., Ramírez-Amaya, V., ... Díaz-Cintra, S. (2020). Morris water maze overtraining increases the density of thorny excrescences in the basal dendrites of CA3 pyramidal neurons. *Behavioural Brain Research*, 379. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.112373>
- González- Franco, D. A., Ramírez-Amaya, V., Joseph-Bravo, P., Prado-Alcalá, R. A., & Quirarte, G. L. (2017). Differential Arc protein expression in dorsal and ventral striatum after moderate and intense inhibitory avoidance training. *Neurobiology of Learning and Memory*, 140(February 2018), 17–26. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2017.02.001>
- Gottesman RF, A. M. (2017). Associations between midlife vascular risk factors and 25 year incident dementia in the atherosclerosis risk in communities (ARIC) cohort. *JAMA Neurol*, 74(10), 1246.
- Grieb, P. (2016). Intracerebroventricular streptozotocin injections as a model of Alzheimer's disease: In search of a relevant mechanism. *Molecular Neurobiology*, 53(3), 1741–1752. <https://doi.org/10.1007/s12035-015-9132-3>
- Grillo, C. A., Piroli, G. G., Lawrence, R. C., Wrighten, S. A., Green, A. J., Wilson, S. P., ... Reagan, L. P. (2015). Hippocampal insulin resistance impairs spatial learning and

- synaptic plasticity. *Diabetes*, 64(11), 3927–3936. <https://doi.org/10.2337/db15-0596>
- Gulinello, M., Gertner, M., Mendoza, G., Schoenfeld, B. P., Oddo, S., LaFerla, F., ... Faber, D. S. (2009). Validation of a 2-day water maze protocol in mice. *Behavioural Brain Research*, 196(2), 220–227. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.09.002>
- Gulyaeva, N. V., Bobkova, N. V., Kolosova, N. G., Samokhin, A. N., Stepanichev, M. Y., & Stefanova, N. A. (2017). Molecular and cellular mechanisms of sporadic Alzheimer's disease: Studies on rodent models in vivo. *Biochemistry*, 82(10), 1427–1443. <https://doi.org/10.1134/S0006297917100029>
- Gupta, S., Yadav, K., Mantri, S. S., Singhal, N. K., Ganesh, S., & Sandhir, R. (2018). Evidence for compromised insulin signaling and neuronal vulnerability in experimental model of sporadic Alzheimer's disease. *Molecular Neurobiology*, 55(12), 8916–8935. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-0985-0>
- Gutiérrez-Rodelo, C., Roura-Guiberna, A., & Olivares-Reyes, J. (2017). Molecular mechanisms of insulin resistance. *Gaceta Médica de México*, 153, 197–209. <https://doi.org/10.1111/j.1464-5491.2005.01566.x>
- Gutierrez Robledo, L. M., & Arrieta Cruz, I. (2014). *Plan de acción Alzheimer y otras demencias*. (Secretaría de Salud & Instituto Nacional de Geriátría, Eds.). Mexico.
- Gutierrez Robledo, L. M., García Peña, M. del C., Roa Rojas, P. A., & Martínez Ruiz, A. (2017). *La enfermedad de Alzheimer y otras demencias como problema nacional de salud*. Academia Nacional de Medicina. Mexico.
- Hamer M, C. Y. (2009). Physical activity and risk of neurodegenerative disease: a systematic review of prospective evidence. *Psychol Med*, 39(1), 3–11.
- Hançer, N. J., Qiu, W., Cherella, C., Li, Y., Copps, K. D., & White, M. F. (2014). Insulin and metabolic stress stimulate multisite serine/threonine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 and inhibit tyrosine phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*, 289(18), 12467–12484. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.554162>
- Hardy, J. A., & Higgins, G. A. (1992). Alzheimer's disease: the amyloid Alzheimer's disease. *Science*, 256, 184–185.
- Herszage, J., & Censor, N. (2018). Modulation of learning and memory: a shared framework for interference and generalization. *Neuroscience*, 392(August), 270–280. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2018.08.006>
- Hippius, H., & Neundörfer, G. (2003). The discovery of Alzheimer's disease. *Dialogues in clinical neuroscience*, 5(1), 101–108.
- Hirosumi, J., Tuncman, G., Chang, L., Görgün, C. Z., Uysal, K. T., Maeda, K., ... Hotamisligil, G. S. (2002). A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature*, 420(6913), 333–336. <https://doi.org/10.1038/nature01137>
- Holtzman, D. M., Morris, J. C., & Goate, A. M. (2011). Alzheimer's disease: The challenge of the second century. *Science Translational Medicine*, 3(77).
- Hoyer, S. (2003). Memory function and brain glucose metabolism. *Pharmacopsychiatry*, 36(SUPPL. 1), 62–67. <https://doi.org/10.1055/s-2003-40452>
- Huerta, K. C., Téllez, G. Y., Salinas, C. A. A., & Díaz, J. M. M. (2013). Funcionamiento cognoscitivo en la diabetes tipo 2: Una revisión. *Salud Mental*, 36(2), 167–175. <https://doi.org/10.17711/sm.0185-3325.2013.020>
- Jack, C. R., Bennett, D. A., Blennow, K., Carrillo, M. C., Dunn, B., Haeberlein, S. B., ... Silverberg, N. (2018). NIA-AA research framework: Toward a biological definition of Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia*, 14(4), 535–562. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2018.02.018>

- Jensen, T., Kiersgaard, M., Sørensen, D., & Mikkelsen, L. (2013). Fasting of mice: a review. *Laboratory Animals*, 47(4), 225–240. <https://doi.org/10.1177/0023677213501659>
- Kapogiannis, D., Boxer, A., Schwartz, J. B., Abner, E. L., Biragyn, A., Masharani, U., ... Goetzl, E. J. (2015). Dysfunctionally phosphorylated type 1 insulin receptor substrate in neural-derived blood exosomes of preclinical Alzheimer's disease. *FASEB Journal*, 29(2), 589–596. <https://doi.org/10.1096/fj.14-262048>
- Keene, C. D., Montine, T. J., & Kuller, L. H. (2018). *Epidemiology, pathology, and pathogenesis of Alzheimer's disease. Up to Date*. Waltham, MA.
- Kim, H. Y., Lee, D. K., Chung, B. R., Kim, H. V., & Kim, Y. (2016). Intracerebroventricular injection of amyloid peptides in normal mice to acutely induce alzheimer-like cognitive deficits. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, 2016(109), 1–6. <https://doi.org/10.3791/53308>
- Knezovic, A., Loncar, A., Homolak, J., Smailovic, U., Osmanovic Barilar, J., Ganoci, L., ... Salkovic-Petrusic, M. (2017). Rat brain glucose transporter-2, insulin receptor and glial expression are acute targets of intracerebroventricular streptozotocin: risk factors for sporadic Alzheimer's disease? *Journal of Neural Transmission*, 124(6), 695–708. <https://doi.org/10.1007/s00702-017-1727-6>
- Knezovic, Ana, Marija, J. O., & Patrick, C. (2015). Staging of cognitive deficits and neuropathological and ultrastructural changes in streptozotocin induced rat model of Alzheimer's disease. *J Neural Transm.* <https://doi.org/10.1007/s00702-015-1394-4>
- Knierim, J. J. (2015). The hippocampus. *Current Biology*, 25(23), R1116–R1121. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.10.049>
- Kochkina, E. G., Plesneva, S. A., Vasilev, D. S., Zhuravin, I. A., Turner, A. J., & Nalivaeva, N. N. (2015). Effects of ageing and experimental diabetes on insulin-degrading enzyme expression in male rat tissues. *Biogerontology*, 16(4), 473–484. <https://doi.org/10.1007/s10522-015-9569-9>
- Langbaum, J. B. S., Chen, K., Lee, W., Reschke, C., Bandy, D., Fleisher, A. S., ... Reiman, E. M. (2009). Categorical and correlational analyses of baseline fluorodeoxyglucose positron emission tomography images from the Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (ADNI). *NeuroImage*, 45(4), 1107–1116. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2008.12.072>
- Larriva-Sahd, J. A. (2014). Some predictions of Rafael Lorente de Nó 80 years later. *Frontiers in Neuroanatomy*, 8(DEC), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fnana.2014.00147>
- Leloup, C., Arluison, M., Lepetit, N., Cartier, N., Marfaing-Jallat, P., Ferré, P., & Pénicaud, L. (1994). Glucose transporter 2 (GLUT 2): expression in specific brain nuclei. *Brain research*, 638(1–2), 221–226. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(94\)90653-x](https://doi.org/10.1016/0006-8993(94)90653-x)
- Lester-Coll, N., Rivera, E. J., Soscia, S. J., Doiron, K., Wands, J. R., & de la Monte, S. M. (2006). Intracerebral streptozotocin model of type 3 diabetes: Relevance to sporadic Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 9(1), 13–33. <https://doi.org/10.3233/JAD-2006-9102>
- Li, Y. (2013). Establishment of experimental models for Alzheimer's disease research. *International Journal of Neuroscience*, 123(12), 823–831. <https://doi.org/10.3109/00207454.2013.804821>
- Liao, F. F., & Xu, H. (2015). Insulin signaling in sporadic Alzheimer's disease. *Science Signaling*, 2(74), 1–7. <https://doi.org/10.1126/scisignal.274pe36>
- López-Álvarez, J., & Agüera-Ortiz, L. (2015). Nuevos criterios diagnósticos de la



- demencia y la enfermedad de Alzheimer: una visión desde la psicogeriatría. *Psicogeriatría*, 5(1), 3–14.
- Lund-Johansen, F., & Browning, M. D. (2017). Should we ignore western blots when selecting antibodies for other applications? *Nature Methods*, 14(3), 215–215. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4192>
- Ma, Q. L., Yang, F., Rosario, E. R., Ubeda, O. J., Beech, W., Gant, D. J., ... Cole, G. M. (2009).  $\beta$ -Amyloid oligomers induce phosphorylation of tau and inactivation of insulin receptor substrate via c-Jun N-terminal kinase signaling: Suppression by omega-3 fatty acids and curcumin. *Journal of Neuroscience*, 29(28), 9078–9089. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1071-09.2009>
- McKhann GM, K. D. (2011). The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*, 7(3), 263–269.
- Mehla, J., Pahuja, M., & Gupta, Y. K. (2013). Streptozotocin induced sporadic Alzheimer's disease: Selection of appropriate dose. *Journal of Alzheimer's Disease*, 33, 17–21. <https://doi.org/10.3233/JAD-2012-120958>
- Mosconi, L., Tsui, W. H., De Santi, S., Li, J., Rusinek, H., Convit, A., ... De Leon, M. J. (2005). Reduced hippocampal metabolism in MCI and AD: Automated FDG-PET image analysis. *Neurology*, 64(11), 1860–1867. <https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000163856.13524.08>
- Mosconi, L., De Santi, S., Li, J., Tsui, W. H., Li, Y., Boppana, M., ... de Leon, M. J. (2008). Hippocampal hypometabolism predicts cognitive decline from normal aging. *Neurobiology of Aging*, 29(5), 676–692. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2006.12.008>
- Mosconi, Lisa, Sorbi, S., de Leon, M. J., Li, Y., Nacmias, B., Myoung, P. S., ... Pupi, A. (2006). Hypometabolism exceeds atrophy in presymptomatic early-onset familial Alzheimer's disease. *Journal of nuclear medicine*, 47(11), 1778–1786.
- Müller, D., Plaschke, K., & Hoyer, S. (1995). Intracerebroventricular injection of streptozotocin: An animal model for sporadic Alzheimer's disease? En I. Hanin, M. Yoshida, & A. Fisher (Eds.), *Alzheimer's and Parkinson's Diseases. Advances in Behavioral Biology* (pp. 389–393). Boston, MA: Springer. [https://doi.org/10.1007/978-1-4757-9145-7\\_58](https://doi.org/10.1007/978-1-4757-9145-7_58)
- Nakhate, K. T., Bharné, A. P., Verma, V. S., Aru, D. N., & Kokare, D. M. (2018). Plumbagin ameliorates memory dysfunction in streptozotocin induced Alzheimer's disease via activation of Nrf2/ARE pathway and inhibition of  $\beta$ -secretase. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 101(February), 379–390. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.02.052>
- National center for biotechnology information. (2021a). N-Nitrosodiethylamine.
- National center for biotechnology information. (2021b). N-Nitrosodimethylamine.
- Oddo, S., Caccamo, A., Shepherd, J. D., Murphy, M. P., Golde, T. E., Kaye, R., ... LaFerla, F. M. (2003). Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: Intracellular A $\beta$  and synaptic dysfunction. *Neuron*, 39(3), 409–421. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00434-3](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00434-3)
- Olivares Reyes, J., & Arellano Plancarte, A. (2008). Mecanismos de acción de la insulina. *Revista de educación bioquímica*, 27(4), 9–18. [https://doi.org/10.1016/0376-4583\(84\)90008-6](https://doi.org/10.1016/0376-4583(84)90008-6)

- Organización Panamericana de la Salud. (1995). *Clasificación estadística internacional de enfermedades y problemas relacionados con la salud*. (OPS, Ed.) (10a ed., Vol. 3v). Washington, D.C.
- Osmanovic Barilar, J., Knezovic, A., Grünblatt, E., Riederer, P., & Salkovic-Petrisic, M. (2014). Nine-month follow-up of the insulin receptor signalling cascade in the brain of streptozotocin rat model of sporadic Alzheimer's disease. *Journal of Neural Transmission*, 122(4), 565–576. <https://doi.org/10.1007/s00702-014-1323-y>
- Ott, A., Stolk, R. P., van Harskamp, F., Pols, H. A. P., Hofman, A., & Breteler, M. M. B. (1999). Diabetes mellitus and the risk of dementia: The Rotterdam study. *Neurology*, 53(9), 1937–1937. <https://doi.org/10.1212/WNL.53.9.1937>
- Paxinos, G., & Franklin, K. B. J. (2004). *The mouse brain in stereotaxic coordinates, 2nd edition*. Academic Press.
- Peña, F., Ordaz, B., Balleza-Tapia, H., Bernal-Pedraza, R., Márquez-Ramos, A., Carmona-Aparicio, L., & Giordano, M. (2010). Beta-amyloid protein (25-35) disrupts hippocampal network activity: Role of Fyn-kinase. *Hippocampus*, 20(1), 78–96. <https://doi.org/10.1002/hipo.20592>
- Prince, M., Bryce, R., Albanese, E., Wimo, A., Ribeiro, W., & Ferri, C. P. (2013). The global prevalence of dementia: a systematic review and metaanalysis. *Alzheimer's & Dementia*, 9(1), 63-75.e2. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2012.11.007>
- Prince, M., Wimo, A., Huerchet, M., Ali, G.-C., Wu, Y.-T., & Prina, M. (2015). *World Alzheimer report 2015. The global impact of dementia. An analysis of prevalence, incidence, costs and trends*. *Alzheimer's Disease International*. London.
- Puzzo, D., Lee, L., Palmeri, A., Calabrese, G., & Arancio, O. (2014). Behavioral assays with mouse models of Alzheimer's disease: Practical considerations and guidelines. *Biochemical Pharmacology*, 88(4), 450–467. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2014.01.011>
- Ramírez-Amaya, V., Escobar, M. L., Chao, V., & Bermúdez-Rattoni, F. (1999). Synaptogenesis of mossy fibers induced by spatial water maze overtraining. *Hippocampus*, 9(6), 631–636. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1063\(1999\)9:6<631::AID-HIPO3>3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1063(1999)9:6<631::AID-HIPO3>3.0.CO;2-3)
- Ravelli, K. G., Rosário, A., Camarini, R., Hernandez, M. S., & Britto, L. R. (2016). Intracerebroventricular streptozotocin as a model of Alzheimer's Disease: Neurochemical and behavioral characterization in mice. *Neurotox Res*. <https://doi.org/10.1007/s12640-016-9684-7>
- Research Models. (s/f). Alzforum. <https://www.alzforum.org/research-models/alzheimers-disease>
- Rosen, G. D., & Harry, J. D. (1990). Brain volume estimation from serial section measurements: a comparison of methodologies. *Journal of Neuroscience Methods*, 35(2), 115–124. [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(90\)90101-K](https://doi.org/10.1016/0165-0270(90)90101-K)
- Rostami, F., Javan, M., Moghimi, A., Haddad-Mashadrizeh, A., & Fereidoni, M. (2017). Streptozotocin-induced hippocampal astrogliosis and insulin signaling malfunction as experimental scales for subclinical sporadic Alzheimer model. *Life Sciences*, 188, 172–185. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2017.08.025>
- Salkovic-Petrisic, M., Knezovic, A., Hoyer, S., & Riederer, P. (2013). What have we learned from the streptozotocin-induced animal model of sporadic Alzheimer's disease, about the therapeutic strategies in Alzheimer's research. *Journal of Neural Transmission*, 120(1), 233–252. <https://doi.org/10.1007/s00702-012-0877-9>

- Samuel, V. T., & Shulman, G. I. (2012). Mechanisms for insulin resistance: Common threads and missing links. *Cell*, 148(5), 852–871. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.017>
- Sasaki-Hamada, S., Ikeda, M., & Oka, J.-I. (2019). Glucagon-like peptide-2 rescues memory impairments and neuropathological changes in a mouse model of dementia induced by the intracerebroventricular administration of streptozotocin. *Scientific Reports*, 9(1), 13723. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50167-3>
- Scahill, R. I., Schott, J. M., Stevens, J. M., Rossor, M. N., & Fox, N. C. (2002). Mapping the evolution of regional atrophy in Alzheimer's disease: unbiased analysis of fluid-registered serial MRI. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(7), 4703–4707. <https://doi.org/10.1073/pnas.052587399>
- Schmidt-Kastner, R. (2015). Genomic approach to selective vulnerability of the hippocampus in brain ischemia–hypoxia. *Neuroscience*, 309, 259–279. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.08.034>
- Schwartz, M. W., Woods, S. C., Porte, D., Seeley, R. J., & Baskin, D. G. (2000). Central nervous system control of food intake. *Nature*, 404(6778), 661–671. <https://doi.org/10.1038/35007534>
- Selkoe, D. J., & Hardy, J. (2016). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Molecular Medicine*, 8(6), 595–608. <https://doi.org/10.15252/emmm.201606210>
- Sepulcre, J., Grothe, M. J., d'Oleire Uquillas, F., Ortiz-Terán, L., Diez, I., Yang, H. S., ... Johnson, K. A. (2018). Neurogenetic contributions to amyloid beta and tau spreading in the human cortex. *Nature Medicine*, 24(12), 1910–1918. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0206-4>
- Soto, M., Cai, W., Konishi, M., & Kahn, C. R. (2019). Insulin signaling in the hippocampus and amygdala regulates metabolism and neurobehavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(13), 6379–6384. <https://doi.org/10.1073/pnas.1817391116>
- Squire, L. R. (2009). The legacy of patient H.M. for neuroscience. *Neuron*, 61(1), 6–9. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.12.023>
- Stanley, M., Macauley, S. L., & Holtzman, D. M. (2016). Changes in insulin and insulin signaling in Alzheimer's disease: Cause or consequence? *Journal of Experimental Medicine*, 213(8), 1375–1385. <https://doi.org/10.1084/jem.20160493>
- Sterniczuk, R., Antle, M. C., Laferla, F. M., & Dyck, R. H. (2010). Characterization of the 3xTg-AD mouse model of Alzheimer's disease: part 2. Behavioral and cognitive changes. *Brain research*, 1348, 149–155. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.06.011>
- Sterniczuk, R., Dyck, R. H., LaFerla, F. M., & Antle, M. C. (2010). Characterization of the 3xTg-AD mouse model of Alzheimer's disease: Part 1. Circadian changes. *Brain Research*, 1348, 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.05.013>
- Sun, C., Li, X., Liu, L., Canet, M. J., Guan, Y., Fan, Y., & Zhou, Y. (2016). Effect of fasting time on measuring mouse blood glucose level. *Int J Clin Exp Med*, 9(2), 4186–4189.
- Szkudelski, T. (2001). The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiological research*, 50(6), 537–546.
- Tinetti, M. E., McAvay, G. J., Murphy, T. E., Gross, C. P., Lin, H., & Allore, H. G. (2012). Contribution of individual diseases to death in older adults with multiple diseases. *Journal of the American Geriatrics Society*, 60(8), 1448–1456.

- <https://doi.org/10.1111/j.1532-5415.2012.04077.x>
- Townsend, M., Mehta, T., & Selkoe, D. J. (2007). Soluble A $\beta$  inhibits specific signal transduction cascades common to the insulin receptor pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 282(46), 33305–33312. <https://doi.org/10.1074/jbc.M610390200>
- Vorhees, C. V., & Williams, M. T. (2014). Assessing spatial learning and memory in rodents. *Institute for Laboratory Animal Research Journal*, 55(2), 310–332. <https://doi.org/10.1093/ilar/ilu013>
- Vorhees, C. V., & Williams, M. T. (2006). Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nature Protocols*, 1(2), 848–858. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.116>
- Wang-Fischer, Y., & Garyantes, T. (2018). Improving the reliability and utility of streptozotocin-induced rat diabetic model. *Journal of Diabetes Research*, 2018, 1–14. <https://doi.org/10.1155/2018/8054073>
- Wang, W., Tanokashira, D., Fukui, Y., Maruyama, M., Kuroiwa, C., Saito, T., ... Taguchi, A. (2019). Serine phosphorylation of IRS1 correlates with A $\beta$ -unrelated memory deficits and elevation in A $\beta$  level prior to the onset of memory decline in AD. *Nutrients*, 11(8), 1942. <https://doi.org/10.3390/nu11081942>
- Willette, A. A., Bendlin, B. B., Starks, E. J., Birdsill, A. C., Johnson, S. C., Christian, B. T., ... Asthana, S. (2015). Association of insulin resistance With cerebral glucose uptake in late middle-aged adults at risk for Alzheimer disease. *Journal of the American Medical Association Neurology*, 72(9), 1013. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2015.0613>
- Zappa Villar, M. F., López Hanotte, J., Falomir Lockhart, E., Trípodí, L. S., Morel, G. R., & Reggiani, P. C. (2018). Intracerebroventricular streptozotocin induces impaired Barnes maze spatial memory and reduces astrocyte branching in the CA1 and CA3 hippocampal regions. *Journal of Neural Transmission*, 125(12), 1787–1803. <https://doi.org/10.1007/s00702-018-1928-7>
- Zhang, Y., Ding, R., Wang, S., Ren, Z., Xu, L., Zhang, X., ... Gong, Y. (2018). Effect of intraperitoneal or intracerebroventricular injection of streptozotocin on learning and memory in mice. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 16, 2375–2380. <https://doi.org/10.3892/etm.2018.6487>
- Zhao, W., Chen, H., Xu, H., Moore, E., Meiri, N., Quon, M. J., & Alkon, D. L. (1999). Brain insulin receptors and spatial memory. *Journal of Biological Chemistry*, 274(49), 34893–34902. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.49.34893>

## 16. ÍNDICE DE TABLAS

- TABLA 1. SE MUESTRA LA DISTRIBUCIÓN CONDUCTUAL E HISTOLÓGICA DE LOS ANIMALES POR GRUPO Y POR CONDICIÓN EXPERIMENTAL. .... 25
- TABLA 2. SE MUESTRA EL ORDEN CRONOLÓGICO EN EL CUAL LOS ANIMALES FUERON LIBERADOS EN EL TANQUE ACUÁTICO DURANTE LA FASE DE ENTRENAMIENTO DEL LAM..... 28
- TABLA 3. RESUMEN DE LAS VARIABLES CONDUCTUALES E HISTOLÓGICAS EVALUADAS A LOS 15 Y 30 DÍAS ..... 50

## 17. ÍNDICE DE FIGURAS

▪ FIGURA 1. DIBUJO CON CÁMARA LUCIDA DE UN CORTE SAGITAL DEL HIPOCAMPO DORSAL CON TÉCNICA DE GOLGI-COX QUE ESQUEMATIZA EL CLÁSICO CIRCUITO TRISINÁPTICO EXCITATORIO HIPOCAMPAL. ....	7
▪ FIGURA 2. FOTOMICROGRAFÍA DE CEREBRO HUMANO CON ENFERMEDAD DE ALZHEIMER DESPUÉS DE UNA TINCIÓN DE BIELSCHOWSKY.....	10
▪ FIGURA 3. IMÁGENES MACROSCÓPICAS DE LA ATROFIA CEREBRAL OBSERVADA EN UNA PERSONA SANA Y UNA PERSONA CON LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.. ....	10
▪ FIGURA 4. VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE LA INSULINA.. ....	16
▪ FIGURA 5. PLANO DEL TANQUE PARA EL LAM DONDE SE REPRESENTAN LOS 4 CUADRANTES DE DIFERENTE COLOR. ....	29
▪ FIGURA 6. IMAGEN REPRESENTATIVA QUE MUESTRA LAS REGIONES DE INTERÉS DELIMITADAS DENTRO DE LOS DIVERSOS SEGMENTOS DEL HIPOCAMPO DORSAL CON LA SEÑAL DE LA TINCIÓN DE NISSL FLUORESCENTE EN EL CANAL DE COLOR GRIS.. ....	32
▪ FIGURA 7. SE MUESTRA LA MEDIA, EL ERROR ESTÁNDAR Y LA DISTRIBUCIÓN INDIVIDUAL DE LOS VALORES DE GLUCOSA EN SANGRE DE LOS GRUPOS VEH Y STZ DE 15 Y 30 DÍAS. ....	34
▪ FIGURA 8. SE MUESTRAN LA MEDIA CON LOS ERRORES ESTÁNDAR DE LAS LATENCIAS DE ESCAPE DE LA FASE DE ENTRENAMIENTO DEL LAM LA CUAL FUE EVALUADA A LOS 15 Y 30 DÍAS.....	36
▪ FIGURA 9. SE MUESTRA LA MEDIA Y EL ERROR ESTÁNDAR DE LAS DIVERSAS EVALUACIONES REALIZADAS EN LA PRUEBA DE RETENCIÓN DEL LAM A LOS 15 DÍAS POSTQUIRÚRGICOS EN LOS GRUPOS VEH Y STZ .....	38
▪ FIGURA 10. SE MUESTRA LA MEDIA Y EL ERROR ESTÁNDAR DE LAS DIVERSAS EVALUACIONES REALIZADAS EN LA PRUEBA DE RETENCIÓN DEL LAM A LOS 30 DÍAS POSTQUIRÚRGICOS EN LOS GRUPOS VEH Y STZ. ....	40
▪ FIGURA 11. IMÁGENES REPRESENTATIVAS DE LA REGIÓN DE CA3 DE LA CAPA PIRAMIDAL (CA3-CP) TOMADAS POR MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA PARA EL PÉPTIDO BA 1-42 EN EL GRUPO VEHÍCULO, EL GRUPO STZ 15 DÍAS, EL GRUPO STZ 30 DÍAS Y UN 3XTG UTILIZADO COMO CONTROL POSITIVO .....	41
▪ FIGURA 12. SE MUESTRA EL PROMEDIO Y EL ERROR ESTÁNDAR DE LA DENSIDAD ÓPTICA RELATIVA DEL RECEPTOR DE INSULINA EN LAS REGIONES DE INTERÉS DENTRO DEL HIPOCAMPO EN LOS GRUPOS VEH Y STZ A LOS 15 DÍAS POSTQUIRÚRGICOS .....	43
▪ FIGURA 13. IMÁGENES REPRESENTATIVAS DE LA REGIÓN DEL HIPOCAMPO DORSAL TOMADAS POR MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA PARA EL RECEPTOR DE INSULINA EN EL GRUPO VEH Y EN EL GRUPO STZ A LOS 15 DÍAS POSTERIORES A LA CIRUGÍA ESTEREOTÁXICA.....	44
▪ FIGURA 14. SE MUESTRA LA MEDIA Y EL ERROR ESTÁNDAR DE LA DENSIDAD ÓPTICA RELATIVA DEL RECEPTOR DE INSULINA EN LAS REGIONES DE INTERÉS DENTRO DEL HIPOCAMPO EN LOS GRUPOS VEH Y STZ A LOS 30 DÍAS POSTQUIRÚRGICOS .....	45
▪ FIGURA 15. IMÁGENES REPRESENTATIVAS DE LA REGIÓN DEL HIPOCAMPO DORSAL TOMADAS POR MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA PARA EL RECEPTOR DE INSULINA EN EL GRUPO VEH Y EN EL GRUPO STZ A LOS 30 DÍAS POSTQUIRÚRGICOS.....	46
▪ FIGURA 16. SE MUESTRA LA MEDIA Y EL ERROR ESTÁNDAR DE LA DENSIDAD ÓPTICA RELATIVA DEL PSRI-1 (SER307) EN LAS REGIONES DE INTERÉS DENTRO DEL HIPOCAMPO EN LOS GRUPOS VEH Y STZ A LOS 15 DÍAS POSTQUIRÚRGICOS .....	47
▪ FIGURA 17. IMÁGENES REPRESENTATIVAS DE LA REGIÓN DEL HIPOCAMPO DORSAL TOMADAS POR MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA PARA EL PSRI-1 (SER307) EN EL GRUPO VEH Y EN EL GRUPO STZ A LOS 15 DÍAS POSTERIORES A LA CIRUGÍA ESTEREOTÁXICA .	48
▪ FIGURA 18. SE MUESTRA LA MEDIA Y EL ERROR ESTÁNDAR DE LA DENSIDAD ÓPTICA RELATIVA DEL PSRI-1 (SER307) EN LAS REGIONES DE INTERÉS DENTRO DEL HIPOCAMPO EN LOS GRUPOS VEH Y STZ A LOS 30 DÍAS POSTQUIRÚRGICOS .....	49
▪ FIGURA 19. IMÁGENES REPRESENTATIVAS DE LA REGIÓN DEL HIPOCAMPO DORSAL TOMADAS POR MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA PARA EL PSRI-1 (SER307) EN EL GRUPO VEH Y EN EL GRUPO STZ A LOS 30 DÍAS POSTERIORES A LA CIRUGÍA ESTEREOTÁXICA .	50