



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO de CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral:

Abordajes terapéuticos en modelos experimentales de la Enfermedad de Alzheimer: potencial antiinflamatorio y neuroprotector de la transferencia génica y celular

Tesista: Lic. Juliette López Hanotte

Directora: Dra. Paula Cecilia Reggiani

Año: 2023

Dedicada a mi eterna amiga,
María del Milagro Solís

Reconocimientos

Al Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata (INIBIOLP) de la Facultad de Ciencias Médicas (FCM), Universidad Nacional de La Plata (UNLP), por haberme brindado el espacio y los medios para la ejecución de esta Tesis.

A las Instituciones que han financiado mi trabajo de investigación y que sustentaron su difusión:

- Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)
- Universidad Nacional de La Plata (UNLP)
- Ministerio de Ciencia y Técnica (MinCyT)
- Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPyT)
- Sociedad Argentina de Investigación en Neurociencias (SAN)
- The International Brain Research Organization (IBRO)
- The Company of Biologists
- Fundación Boehringer Ingelheim (BIF)
- CAJAL Advanced Neuroscience Training Programme

Agradecimientos

En primer lugar, deseo expresar mi agradecimiento a mi directora de tesis doctoral, la Dra. Paula Cecilia Reggiani por haber compartido conmigo todo su conocimiento, por enseñarme pacientemente, por confiar en mí, y acompañarme durante seis años tanto profesional como personalmente. Por otro lado, creo sinceramente que no habría podido realizar este trabajo sin el apoyo de mis compañeros y compañeras de laboratorio del INIBIOLP... les agradezco profundamente por haberme ayudado, acompañado y sobre todo, por brindarme una hermosa amistad, que estoy segura perdurará; gracias a: Florencia Zappa Villar, Facundo Peralta, Eugenia Falomir Lockhart, Priscila Chiavellini, Martina Canatelli Mallat, Marianne Lehmann, Natalia Scelsio, Araceli Bigres, Franco Dolcetti y Abril Vidal. Por supuesto, agradezco enormemente al resto de los integrantes del laboratorio por compartir su conocimiento conmigo y brindarme valiosos consejos: a la Dra. María José Bellini, al Dr. Gustavo Morel, y al Dr. Joaquin Pardo.

También quisiera agradecer a la Dra. Carole Escartin, por haberme invitado a su laboratorio y confiado en mí durante todo el desarrollo de mi pasantía. Junto a ella, agradezco muchísimo a la Dra. María Ángeles Carillo-de-Sauvage, por haberme recibido cálidamente y ayudado a completar los objetivos planteados. Gracias también a sus estudiantes, que me incluyeron amistosamente desde el primer día e hicieron de mi estancia en Francia una experiencia inolvidable.

Por fuera del ámbito profesional, quiero darle las gracias a mi familia salteña y transatlántica, por alentarme desde el primer minuto, por amarme y por siempre recibirme con los brazos abiertos. No tengo palabras para agradecer a mi mamá y a mi papá. Gracias a mis hermanas Capucine, Manon, y Violette, a mis abuelas Bali y Mamie, a mis tíos y tías, Christophe, Valérie, Sabine y Marc, y a todos mis primos y primas, pero en especial a Coline y a Étienne, por su ayuda física y emocional durante mi estadía en París. Gracias también a Ramiro Caporin, por acompañarme con amor día a día desde el principio de mi carrera científica, y a quien después de tantos años compartidos considero también parte de mi familia. Por último, pero no menos importante, gracias a todas mis amigas, a las que desde la distancia me apoyaron, pero especialmente a Luisina Cimatti, Karen Schurmann, Maylen Schvarztein y Ana Luz Kruger, quienes viven en La Plata-Buenos Aires y me alentaron en cada etapa de mi carrera, supieron entender los tiempos de una becaria doctoral, y me dieron fuerzas cuando lo necesitaba.

Trabajos científicos realizados durante el doctorado

Publicaciones en revistas con referato

- **López Hanotte J***, Peralta F*, Reggiani PC#, Zappa Villar MF#. Investigating the impact of intracerebroventricular streptozotocin on female rats: implications for Alzheimer's Disease. **Autores con contribución equivalente. *Experimental Neurology*. Enviado: Octubre 2023
- Zappa Villar MF*, **López Hanotte J***, Crespo R, Pardo J, Reggiani PC. Insulin-Like GrowthFactor 1 gene transfer for sporadic Alzheimer's Disease: new evidence for trophic factor-mediated hippocampal neuronal and synaptic recovery based behavior improvement. *Autores con contribución equivalente. *Hippocampus*. 2021. <https://doi.org/10.1002/hipo.23379>
- Zappa Villar MF, **López Hanotte J**, Pardo J, Morel GR, Mazzolini G, García MG, Reggiani PC. Mesenchymal stem cells therapy improved the streptozotocin-induced behavioral and hippocampal impairment in rats. *Molecular Neurobiology*. 2019. doi: 10.1007/s12035-019-01729-z
- Zappa Villar MF, **López Hanotte J**, Falomir Lockhart E, Trípodí LS, Morel GR, Reggiani PC. Intracerebroventricular streptozotocin induces impaired Barnes maze spatial memory and reduces astrocyte branching in the CA1 and CA3 hippocampal regions. *Journal of Neural Transmission*. 2018. <https://doi.org/10.1007/s00702-018-1928-7>

Comunicaciones en reuniones científicas nacionales e internacionales

- **López Hanotte J**. "Streptozotocin induces behavioral changes and reactive astrocytes in a sex-dependent manner" (disertante y poster). *XXXVIII Congreso Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Neurociencias (SAN)*. 4-7 de octubre, 2023, San Luis, Argentina.
- Peralta F, Vidal Escobedo AA, **López Hanotte J**, Zappa Villar MF, Reggiani PC*, Pardo J*. "Highly selective gene therapy in a rat model of sporadic Alzheimer's disease: use of adeno-associated viral vectors to overexpress IGF1 in hippocampal astrocytes" (poster). *Alzheimer's Association International Conference (AAIC)*. 16-20 de julio, Amsterdam, Países Bajos.
- **López Hanotte J**. "Efecto del sexo y de las hormonas ováricas en el comportamiento y en los astrocitos reactivos en un modelo de la enfermedad de Alzheimer esporádica" (disertante). *AAIC Neuroscience Next 2023*, 20 de abril, 2023, Universidad Maimónides, Buenos Aires.
- **López Hanotte J***, Peralta F*, Posadas I, Reggiani PC. "Intramuscular thymulin gene therapy restores behavior and memory in a model of sporadic Alzheimer's disease in rats" (poster). *Jornadas de Medicina de la Universidad Nacional de La Plata*. 29 de noviembre, 2022, La Plata, Argentina.
- Peralta F, Vidal Escobedo AA, **López Hanotte J**, Reggiani PC, Pardo J. "IGF1 gene therapy targeting hippocampal astrocytes by astrocyte-selective bicistronic adeno-associated virus prevents memory and behavioral impairment in a rat model of sporadic Alzheimer's disease" (poster). **Trabajo ganador del**

primer premio en las Jornadas de Medicina de la Universidad Nacional de La Plata. 29 de noviembre, 2022, La Plata, Argentina.

- **López Hanotte J***, Zappa Villar MF*, Peralta F, Reggiani PC. “A sporadic Alzheimer's disease model in male and female rats: behavioral differences and hippocampal impairment in streptozotocin-injected rats” (poster). *International Conference on Alzheimer's and Parkinson's Diseases and related neurological disorders*. 15-20 de marzo, 2022, Barcelona, España.
- **López Hanotte J**, Zappa Villar MF, Pardo J, Camihort G, Reggiani PC. “Neuroprotective Insulin-like Growth Factor 1 (IGF1) gene therapy for a rat model of sporadic Alzheimer's disease” (poster). *XXXIV Congreso Anual SAN*. 3-5 de octubre, 2019, Córdoba, Argentina.
- **López Hanotte J**, Zappa Villar MF, Pardo J, Reggiani PC. “Mesenchymal stem cells therapy reversed hippocampal atrophy, neurodegeneration, loss of presynaptic proteins, reactive microglia and behavior impairment in a rat model of sporadic Alzheimer's disease” (poster). *XXXIII Congreso Anual SAN*. 24-26 de octubre, 2018, Córdoba, Argentina.

Contenidos

Abreviaturas.....	11
Resumen	12
Resumen gráfico.....	14
Capítulo I: Introducción.....	15
1.1 Enfermedad de Alzheimer	15
1.1.1 Generalidades, incidencia y prevalencia	15
1.1.2 Síntomas clínicos.....	15
1.1.3 Características histopatológicas	16
1.1.4 Enfermedad de Alzheimer familiar y esporádica	20
1.1.5 Mecanismos patológicos de la enfermedad de Alzheimer	22
1.1.6 Tratamiento para la enfermedad de Alzheimer	29
1.2 Modelos murinos de la enfermedad de Alzheimer	30
1.2.1 Ratones transgénicos	30
1.2.2 El modelo de estreptozotocina intracerebroventricular en rata: modelo de enfermedad de Alzheimer esporádica.....	30
1.3 Diferencias sexuales en neurociencia	31
1.3.1 Diferencias sexuales en trastornos neurológicos y neurodegenerativos.....	32
1.3.2 Rol de las hormonas ováricas en el cerebro.....	32
1.3.3 Estudio de diferencias sexuales en investigaciones preclínicas	33
1.4 Potencial terapéutico de factores neuroprotectores y antiinflamatorios.....	34
1.4.1 IGF1 como molécula neuroprotectora	34
1.4.2 Factor tímico sérico o timulina.....	37
1.5 Transferencia de genes terapéuticos	39
1.5.1 Generalidades	39
1.5.2 Métodos de transferencia génica.....	39
1.5.3 Terapia génica con IGF1	43
1.5.4 Terapia génica de timulina	44
1.6 Terapia con células madre mesenquimales	44
1.6.1 Células madre: generalidades	45
2 Capítulo II: Hipótesis y objetivos.....	48
2.1 Hipótesis.....	48
2.2 Objetivos específicos.....	49

3	Capítulo III: Materiales y métodos	50
3.1	Preparación de estreptozotocina	50
3.2	Vectores adenovirales	50
3.2.1	Vector RAd-IGF1	50
3.2.2	Vector RAd-metFTS	50
3.2.3	Amplificación y titulación de los vectores.....	50
3.3	Obtención del secretoma de células madre mesenquimales	51
3.4	Procedimientos en animales.....	52
3.4.1	Animales.....	52
3.4.2	Cirugías estereotáxicas.....	52
3.4.3	Ovariectomía.....	53
3.4.4	Inyección intramuscular	53
3.4.5	Instilación intranasal	53
3.4.6	Peso corporal.....	54
3.4.7	Test de comportamiento	54
3.4.8	Eutanasia y obtención de cerebros.....	56
3.5	Procesamiento de las muestras	57
3.5.1	Anticuerpos	57
3.5.2	Inmunohistoquímica	59
3.5.3	Inmunofluorescencia	59
3.5.4	Obtención y análisis de imagen	60
3.5.5	Western blot.....	64
3.6	Diseño experimental Objetivo 1.....	64
3.7	Diseño experimental Objetivo 2.....	65
3.8	Diseño experimental Objetivo 3.....	66
3.9	Diseño experimental Objetivo 4.....	66
3.10	Diseño experimental Objetivo 5.....	67
3.11	Diseño experimental Objetivo 6.....	68
3.12	Análisis estadístico	68
4	Capítulo IV: Caracterización del modelo de STZ-icv en ratas macho a 25 y 95 días post inyección....	70
4.1	Objetivo.....	70
4.2	Resultados.....	70
4.2.1	Descenso en el peso corporal por inyección de STZ-icv.....	70

4.2.2	Alteraciones de memoria en el modelo de STZ-icv.....	71
4.2.3	Expresión de pTau y péptido β A en el modelo de STZ-icv.....	73
4.2.4	Incremento de la glía reactiva en el modelo de STZ-icv.....	74
4.2.5	Atrofia en el <i>Stratum Radiatum</i> de CA1 en el modelo de STZ-icv.....	77
4.3	Discusión.....	78
4.4	Conclusión.....	85
5	Capítulo V: Abordajes terapéuticos en el modelo de STZ-icv.....	86
5.1	Objetivos.....	86
5.2	Resultados de terapia génica con IGF1.....	86
5.2.1	La transferencia del gen IGF1 restauró el comportamiento en el modelo de STZ-icv.....	86
5.2.2	La transferencia del gen IGF1 activó su señalización en el hipocampo del modelo de STZ-icv	88
5.2.3	La transferencia del gen IGF1 moduló la población microglial del hipocampo.....	88
5.2.4	La transferencia del gen IGF1 restauró la población neuronal inmadura y los niveles de proteínas sinápticas.....	90
5.2.5	Correlación entre el comportamiento y los niveles de proteínas neuronales del hipocampo	93
5.3	Discusión del experimento de terapia génica con IGF1.....	94
5.4	Resultados de terapia génica con timulina.....	98
5.4.1	La terapia con timulina disminuyó la ansiedad y mejoró parcialmente los comportamientos típico de especie, exploratorio y símil depresión.....	98
5.4.2	La terapia con timulina restauró la memoria de reconocimiento pero no la memoria espacial	98
5.4.3	La terapia con timulina no recuperó las neuronas inmaduras en el giro dentado.....	100
5.4.4	Efecto inmunomodulador de la terapia con timulina en las células gliales del hipocampo	100
5.5	Discusión del experimento de terapia génica con timulina.....	101
5.6	Resultados del experimento de terapia celular con el secretoma de células madre mesenquimales.....	105
5.6.1	Comportamiento típico de especie y ansiedad.....	105
5.6.2	Memoria de reconocimiento y espacial.....	105
5.6.3	Comportamiento símil depresión.....	108
5.7	Discusión del experimento de terapia con secretoma de células madre mesenquimales.....	109
5.8	Conclusión.....	111

6	Capítulo VI: Estudio del efecto de la STZ-icv en ratas hembra y comparación con el modelo de enfermedad de Alzheimer esporádica en ratas macho	113
6.1	Objetivos	113
6.2	Resultados de inyección de STZ-icv en ratas hembra con ovarios y ovariectomizadas	113
6.2.1	Variación del peso corporal después de la ovariectomía y de la inyección de STZ.....	113
6.2.2	La STZ-icv afecta el enterramiento y el comportamiento exploratorio dependiendo del estatus ovárico	113
6.2.3	Memoria de reconocimiento afectada por la STZ y la ovariectomía	115
6.2.4	Memoria espacial en ratas hembra tras la inyección de STZ-icv.....	116
6.2.5	La STZ-icv y la ovariectomía aumentaron el comportamiento símil depresión	117
6.2.6	La STZ-icv no aumentó la expresión de proteínas relevantes para la enfermedad de Alzheimer	117
6.2.7	La STZ-icv afecta a las neuronas maduras e inmaduras del giro dentado.....	118
6.2.8	Aumento de reactividad microglial por inyección de STZ-icv y ovariectomía.....	118
6.3	Discusión del efecto de STZ-icv en ratas hembra.....	120
6.4	Resultados de la evaluación de diferencias sexuales en el modelo de STZ-icv.....	125
6.4.1	Diferencias sexuales en la memoria por inyección de STZ-icv	125
6.4.2	La STZ afecta a las neuronas inmaduras independientemente del sexo.....	126
6.4.3	Reactividad de los astrocitos por inyección de STZ-icv en machos y hembras	128
6.4.4	Diferencias sexuales en la pérdida de sinapsis hipocampales por STZ-icv.....	131
6.4.5	La STZ-icv no afecta las proteínas astrocíticas Kir4.1 y GLT1.....	132
6.5	Discusión de las diferencias sexuales en el modelo de STZ-icv.....	134
6.6	Conclusion.....	139
7	Capítulo VII: Conclusiones generales	140
	Bibliografía	143

Abreviaturas

βA: β -amiloide	JAK: Quinasas Janus
Ad: adenovirus	KO: Knock out
APP: Proteína precursora de amiloide	LB: Laberinto de Barnes
BDNF: Factor neurotrófico derivado del cerebro	LCR/a: Líquido cefalorraquídeo/artificial
BHE: Barrera hematoencefálica	LPS: Lipolisacárido
CA: Campo abierto	MB: Enterramiento de canicas
CET: Células epiteliales tísticas	MSC: Células madre mesenquimales
DCX: Doblecortina	MWM: Morris Water Maze
DEx: Días experimentales	NF: Nado forzado
DM: Diabetes mellitus	NGS: Suero normal de cabra
EA: Enfermedad de Alzheimer	NMDA: Receptor del ácido N-metil-D-aspartico
EAe: Enfermedad de Alzheimer esporádica	NSC: Células madre neurales
EAF: Enfermedad de Alzheimer familiar	ONF: Ovillos neurofibrilares
FTS: Factor tímico sérico	OVX: ovariectomizado/ovariectomizada
GD: Giro dentado	PB: Buffer fosfato
GFAP: Proteína ácida fibrilar glial	PET: Tomografía por emisión de positrones
GLUT2: Transportador de glucosa de tipo 2	PFA: Paraformaldehído
GS: Goal sector = sector meta	PI3K: Fosfatidilinositol 3 quinasa
GSK3β: Glucógeno sintasa quinasa-3 β	PSA-NCAM: Forma polisialilada de la molécula de adhesión celular neural
HEK 293: Línea celular transgénica derivada de riñón de embrión humano 293	PSN: Presenilina
HSC: Células madre hematopoyéticas	PT: Prueba de memoria
I.D.: Índice de discriminación	RAd: adenovirus recombinante
icv: Intracerebroventricular	RI: Receptor de insulina
IF: Inmunofluorescencia	RO: Reconocimiento de objetos
IGF1: Factor de crecimiento insulínico tipo 1	ROI: Región de interés
IGF1R: Receptor de factor de crecimiento insulínico tipo 1	ROS: Especies reactivas del oxígeno
IHQ: Inmunohistoquímica	Sc: secretoma
IL: Interleuquina	SFB: Suero fetal bovino
ILP: Péptidos insulino similares	SGZ: Zona subgranular
im: Intramuscular	SLM: Stratum Lacunosum Moleculare
ip: intraperitoneal	SNC: Sistema nervioso central
ir: inmunorreactivas	SR: Stratum Radiatum
IRA: Área inmunorreactiva	STAT: Proteína transductora de señales y activadora de la transcripción
IRS: Sustrato del receptor de insulina	STZ: Estreptozotocina
ITR: Repeticiones terminales invertidas	ufp: Unidades formadoras de placa
iv: intravenosa	

Resumen

La enfermedad de Alzheimer esporádica (EAe) es la forma más común de demencia, en la que los pacientes típicamente sufren deterioro cognitivo marcado por degeneración irreversible en el hipocampo y otras áreas cerebrales. Actualmente no existe una cura efectiva para esta patología, por lo que el propósito principal de esta Tesis Doctoral fue avanzar en el desarrollo de estrategias terapéuticas para prevenir o revertir los cambios neurodegenerativos y el deterioro cognitivo asociados a la EAe, utilizando un modelo animal generado mediante inyección intracerebroventricular (icv) de estreptozotocina (STZ) en ratas macho. Por otro lado, aunque la EAe es más frecuente en mujeres, los informes sobre este modelo aplicado en hembras son escasos, por lo que en el presente trabajo también nos hemos enfocado en realizar una caracterización del comportamiento y de los cambios moleculares y celulares en ratas hembra inyectadas con STZ-icv, como primer paso para establecer un modelo hembra de EA, el cual en un futuro podría ser utilizado para el ensayo de diversas terapias.

Evaluamos los efectos de la STZ-icv en ratas macho a 25 y 95 días post inyección, lo que corresponde a un modelo de EAe de corto y de mediano plazo, respectivamente. Específicamente, estudiamos la memoria, la expresión del péptido β -amiloide (β A) y la fosforilación de Tau (pTau), la reacción de células gliales, y la morfometría del hipocampo. Si bien a ambos tiempos observamos déficit de memoria, reactividad glial y atrofia hipocampal, sugerimos que a tiempos cortos post inyección, la respuesta aguda a la STZ es más pronunciada que en un mediano plazo. Nuestros resultados generaron una referencia para los siguientes experimentos utilizando diversas estrategias terapéuticas.

En primer lugar, en el modelo de EAe de corto plazo, evaluamos el potencial de la terapia génica con el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF1). Demostramos que la activación exógena de la vía de señalización del IGF1 disminuyó la expresión de pTau, y mejoró notablemente el comportamiento y la memoria alterados por la STZ. Por otro lado, observamos un aumento de la reactividad de las células microgliales del hipocampo, que hipotetizamos que ejercen efectos antiinflamatorios. Además, la transferencia del gen IGF1 indujo una recuperación significativa de las neuronas inmaduras y aumentó los niveles de proteínas sinápticas. Por lo tanto, este estudio proporciona pruebas sólidas del potencial terapéutico de este factor trófico por lo que su uso podría extenderse a otros modelos de EA.

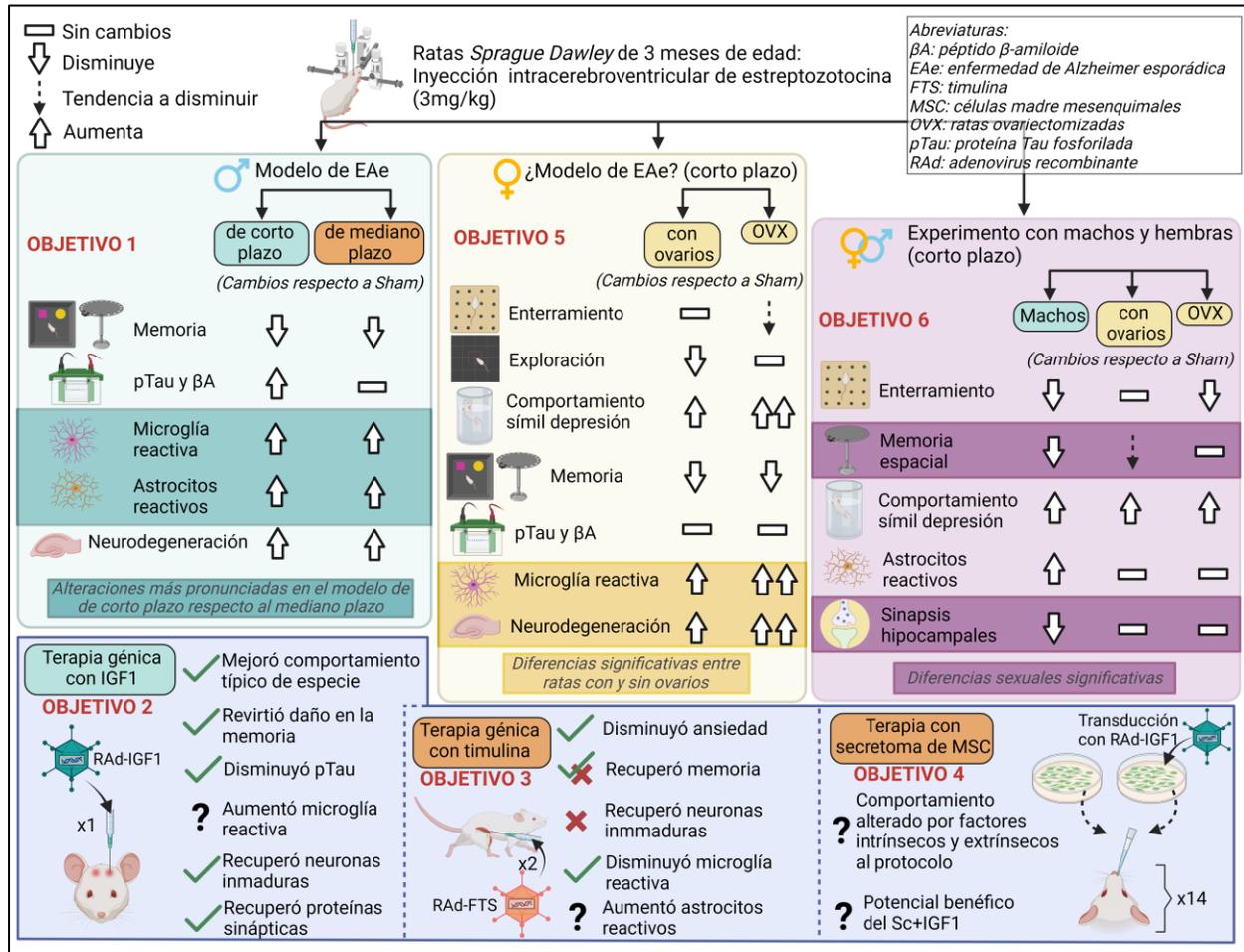
En segundo lugar, utilizamos el modelo de EAe de mediano plazo para implementar terapia génica con timulina, un péptido con propiedades antiinflamatorias que hasta el momento no fue ensayado en ningún modelo de enfermedad neurodegenerativa, constituyendo este un estudio novedoso. Nuestros resultados demuestran que la timulina tiene propiedades inmunomodulatorias en el hipocampo, ya que promovió cambios en la reactividad y número de las células gliales, al mismo tiempo que disminuyó la ansiedad y recuperó la memoria de reconocimiento afectada por la STZ. Sin embargo, a diferencia del tratamiento con IGF1, la timulina no logró recuperar el número de neuronas inmaduras del hipocampo. Por último, realizamos un experimento de instilación intranasal con el secretoma de células madre mesenquimales (MSC) transducidas previamente con IGF1, con el objetivo de crear una terapia que combine un componente antiinflamatorio (como lo tienen las MSC), y un componente neurotrófico (dado por el IGF1), para contrarrestar los cambios gliales y neurodegenerativos inducidos por la STZ. Sin embargo, detectamos resultados de comportamiento no esperados para nuestros animales, de las cuales

concluimos que diversos factores, tanto intrínsecos como extrínsecos a nuestro protocolo podrían haber influenciado en los resultados obtenidos.

Finalmente, realizamos dos experimentos de corto plazo utilizando ratas hembra. El primero tuvo como objetivo estudiar el efecto de la inyección de STZ-icv en ratas con y sin ovarios, para evaluar adicionalmente de esta forma, una potencial acción neuroprotectora de los esteroides ováricos frente a la STZ. Observamos que la droga afectó algunos comportamientos dependiendo del estado ovárico de los animales (específicamente el enterramiento y el comportamiento exploratorio), y que la memoria de reconocimiento se vió afectada por la inyección tanto en hembras con y sin ovarios. A nivel morfo-histoquímico, la STZ afectó a la población neuronal del giro dentado, y aumentó las células microgliales reactivas. Curiosamente, la STZ no alteró la expresión del péptido β A ni de pTau.

El segundo experimento se realizó en conjunto con ratas macho, para evaluar diferencias sexuales en comportamiento, astrocitos, neuronas inmaduras y sinapsis. Nuestro trabajo demuestra que la STZ produce cambios celulares y comportamentales dependiendo del sexo, aunque algunas alteraciones resultan conservadas entre machos y hembras, como el deterioro en la memoria de reconocimiento, el comportamiento símil depresivo, y la pérdida de neuronas inmaduras. Sin embargo, la STZ no afectó con la misma magnitud a las ratas hembra en cuanto al enterramiento y la memoria espacial. Adicionalmente, la STZ no incrementó la reactividad astrocitaria ni afectó a las sinapsis del hipocampo, independientemente del estado ovárico de los animales hembra. Por lo tanto, concluimos que en ciertos parámetros, las hembras mostraron resistencia a la neurotoxicidad inducida por STZ en comparación a los machos. Nuestro estudio avanza en la descripción de los efectos de la STZ-icv en ratas hembra, y resalta la necesidad de seguir investigando para descubrir los intrincados mecanismos que subyacen a las diferencias sexuales encontradas.

Resumen gráfico



Capítulo I: Introducción

1.1 Enfermedad de Alzheimer

1.1.1 Generalidades, incidencia y prevalencia

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la enfermedad neurodegenerativa y causa de demencia más frecuente (Gaugler et al., 2023), para la cual aún no se encontró una cura. La demencia es un término genérico para un síndrome de etiología heterogénea entre individuos, en el que se produce una pérdida progresiva de la memoria, un deterioro del razonamiento, del comportamiento y de la capacidad para realizar las actividades cotidianas. La EA fue caracterizada por primera vez por Alois Alzheimer, neurólogo alemán, en 1906. El Dr. Alzheimer examinó a una paciente de 51 años, Augustus D., con pérdida de memoria, pérdida del lenguaje y trastornos psicológicos. Luego de su muerte, describió las principales características histológicas de la enfermedad: atrofia del cerebro y dos tipos de depósitos dentro y fuera de las células neuronales, los ovillos neurofibrilares (ONF) y las placas amiloides, respectivamente (traducción al inglés del documento original de Alzheimer de 1907: Stelzma et al., 1995).

La EA puede definirse como un proceso neurodegenerativo progresivo e irreversible caracterizado por la pérdida de memoria, de habilidades intelectuales y de razonamiento, así como por desorientación espaciotemporal, cambios de humor, alteraciones conductuales, afasia (disminución progresiva de la capacidad del lenguaje), apraxia (alteración de los gestos e incapacidad de realizar tareas rutinarias) y agnosia (incapacidad de reconocimiento de personas o cosas). En general, la esperanza de vida de una persona con Alzheimer es de alrededor de 8 a 10 años después de su diagnóstico.

Actualmente existen alrededor de 55 millones de personas con demencia en todo el mundo, de las cuales el 60-70% de los casos son diagnosticados como EA (Gaugler et al., 2023). Se estima que países con ingresos medios y bajos, como los de América Latina, tendrán un mayor aumento en la prevalencia de la EA, comparado con países de mayor nivel económico. Por ejemplo, para el 2050, se espera que la prevalencia de demencia a nivel mundial aumente a 135 millones de personas, con el 71% de casos correspondiendo a países pobres (Alzheimer Argentina et al., 2019).

1.1.2 Síntomas clínicos

La EA se caracteriza no solo por afectar a los procesos mnemónicos, sino también por afectar la función cognitiva en su totalidad, de una manera extremadamente grave, al punto de generar importantes cambios de personalidad y de privar a la persona de su completa autonomía. Es importante resaltar que la EA no constituye parte del proceso natural que es el envejecimiento normal, sino que ambos son procesos diferentes que afectan la función cognitiva de una persona de diversas maneras. Algunos cambios cognitivos normales asociados con el envejecimiento incluyen una disminución gradual en la velocidad de procesamiento de información, una disminución en la capacidad de memoria a corto plazo y dificultades en la atención selectiva. Sin embargo, estos cambios cognitivos suelen ser leves y no afectan significativamente la capacidad de una persona para llevar a cabo actividades de la vida cotidiana, al menos hasta un estado muy avanzado del envejecimiento.

Los primeros síntomas de la EA empiezan a ocurrir alrededor de 3 años antes de su diagnóstico (Jost & Grossberg, 1995), y estos incluyen dificultad en recordar nueva información y cambios en el estado de ánimo, la ansiedad y el sueño. Los individuos con EA leve, manifiestan cambios variables y/o deterioros

en múltiples dominios cognitivos, funcionales y conductuales. Los patrones de cambio pueden superponerse, pero no forman parte del envejecimiento cognitivo normal, como lo manifiestan los efectos diferenciales del envejecimiento y la EA en las redes neuronales cognitivas (Chhatwal et al., 2018). El aumento de la ansiedad, los síntomas depresivos, la apatía y el retraimiento son muy frecuentes en las fases preclínicas o tempranas de la EA.

Respecto a los diferentes sistemas de memoria, la memoria episódica es la más relevante clínicamente para los pacientes con EA (Nestor et al., 2006). Este tipo de memoria permite recordar conscientemente un episodio concreto de la propia vida, y contiene información precisa de tiempo y espacio, como, por ejemplo, compartir una comida con un amigo. Sin embargo, a medida que la capacidad de memoria episódica disminuye en los pacientes con EA, los acontecimientos del pasado lejano se recuerdan relativamente mejor que los que ocurrieron después o poco antes del inicio de la enfermedad (Sagar et al., 1988).

El reconocimiento de los siguientes diez síntomas o signos de alerta y una evaluación adecuada es el primer paso para una atención eficaz: 1) pérdida de memoria que afecta la vida diaria; 2) dificultad en planificar y resolver problemas; 3) dificultad en completar tareas habituales; 4) confusión con el tiempo y el espacio; 5) problemas para entender imágenes visuales y relaciones espaciales; 6) aparición de problemas con palabras, de manera oral o escrita; 7) extraviar las cosas y perder la capacidad de volver sobre los pasos; 8) disminución o falta de juicio; 9) abandono del trabajo o actividades sociales; y 10) cambios de humor y de personalidad. En estadios severos y avanzados de la EA, se observa una progresión a síntomas de etapas posteriores, como alteraciones del juicio, desorientación y confusión; cambios conductuales importantes, como agresividad y agitación; y trastornos neurológicos, como delirios y alucinaciones (Alzheimer's Association).

1.1.3 Características histopatológicas

1.1.3.1 Macroscópicas

A nivel macroscópico, se observa un patrón típico de atrofia cortical predominantemente en el lóbulo temporal medial (que forma parte del sistema límbico), y relativamente moderado en las cortezas motora, sensorial y visual (de Flores et al., 2022; Visser et al., 2002). Como resultado de esta atrofia se observa un adelgazamiento de las circunvoluciones, ensanchamiento de los surcos, engrosamiento de las meninges y dilatación de las cavidades ventriculares (**Fig. 1B**) (Castellani et al., 2010; Dickerson et al., 2009, 2011).

El lóbulo temporal medial se compone de varias subregiones que incluyen el hipocampo, así como la corteza entorrinal (CER), la corteza perirrinal (CPR) y la corteza parahipocampal (CPH) (**Fig. 1A**). Estas diferentes regiones no funcionan de forma aislada, sino que están conectadas entre sí con el resto del cerebro a través de dos redes específicas que convergen en el hipocampo. Por un lado, la red anterotemporal, compuesta por la CPR, el hipocampo anterior, la CER lateral, la amígdala y las cortezas orbitofrontal temporopolar y lateral, sirve de apoyo a la memoria semántica y de objetos, la percepción de objetos y el procesamiento afectivo/emocional. Por otro, la red posteromedial, compuesta por la CPH, el hipocampo posterior, la CER medial, la corteza retrosplenial, el precuneus, el giro angular y la corteza prefrontal medial, está implicada preferentemente en la memoria episódica, la percepción de escenas y la cognición social (Ranganath & Ritchey, 2012).

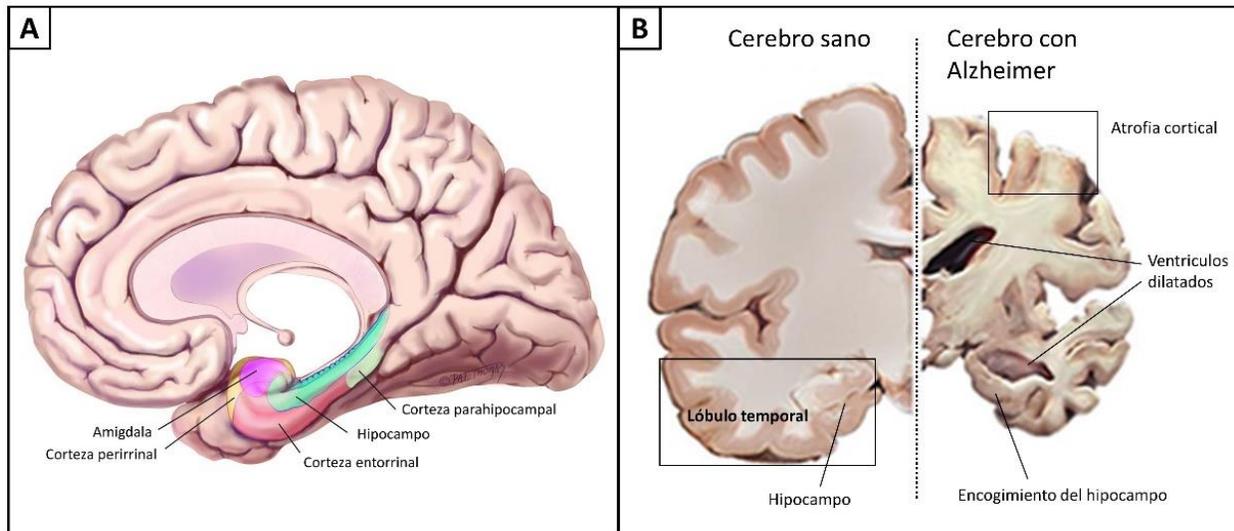


Figura 1: Cerebro humano sano y con EA. Representación de un corte sagital del cerebro mostrando en color componentes del lóbulo temporal medial: corteza parahipocampal (verde lima), hipocampo (verde), corteza entorrinal (rojo), amígdala (fucsia) y corteza perirrinal (amarillo); figura adaptada de Raslau et al., 2015) (A). Representación de un corte coronal del cerebro mostrando a la izquierda un cerebro sano y a la derecha un cerebro con EA (B).

Se ha demostrado que existen sutiles anomalías neuroanatómicas detectables en individuos asintomáticos casi una década antes de que se les diagnostique demencia por EA (Dickerson et al., 2011; N. C. Fox et al., 1996; J.A. Kaye et al., 1997). Entre los principales biomarcadores de la EA, la atrofia del hipocampo es el mejor establecido y validado, utilizado en estudios de investigación para estadificar la progresión de la patología de la EA en el cerebro a lo largo de todo el espectro de la enfermedad (Jack et al., 2011; L. Su et al., 2018)

1.1.3.2 Microscópicas

Las principales características neuropatológicas de la enfermedad consisten en depósitos anormales de proteínas, que conforman ONF de la proteína Tau agregada y placas amiloides extracelulares del péptido β -amiloide (β A) (Serrano-Pozo et al., 2011). Si bien el diagnóstico de la EA se realiza por imagen (a través de imágenes por resonancia magnética y tomografía por emisión de positrones [PET]), los ONF y las placas amiloides, descritos por el Dr. Alois Alzheimer hace más de 100 años, constituyen las estructuras histopatológicas *post mortem* para la validación y el diagnóstico definitivo de la enfermedad (Montine et al., 2012; Newell et al., 1999).

El péptido β A es generado a partir de la proteólisis de la glicoproteína transmembrana precursora de amiloide (APP). Dicha proteólisis se obtiene por la acción secuencial de un grupo de enzimas llamadas secretasas, que pueden actuar por dos vías distintas. La primera de ellas es la vía no amiloidogénica (**Fig. 2, izquierda**), que no es patológica, en la cual las α - y γ secretasas clivan secuencialmente la APP formando el fragmento soluble p3. Sin embargo, la APP puede ser procesada por una vía alternativa, siendo sustrato de la acción de las β y γ secretasas, que generan fragmentos amiloidogénicos β A, comúnmente de 40 y 42 aminoácidos (β A₁₋₄₀ y β A₁₋₄₂, respectivamente) (**Fig. 2, derecha**) (LaFerla et al., 2007). La forma con 42 residuos es la más abundante en las placas amiloides, ya que a más largo el péptido, más hidrofóbicos se

vuelven, por lo cual tienen más probabilidades de agregación. Las placas amiloides, formadas mediante un proceso complejo que parece ser dependiente del tipo celular, requieren como primer paso la internalización de estos péptidos y la formación de agregados intracelulares, previo a su externalización (Friedrich et al., 2010; D. M. Walsh et al., 2000). Si bien las placas amiloides son una característica distintiva de la EA, las investigaciones científicas demuestran que son las formas solubles del péptido β A las principales desencadenantes de varias cascadas patológicas (Cleary et al., 2005; D. M. Walsh et al., 2002; D. M. Walsh & Selkoe, 2007).

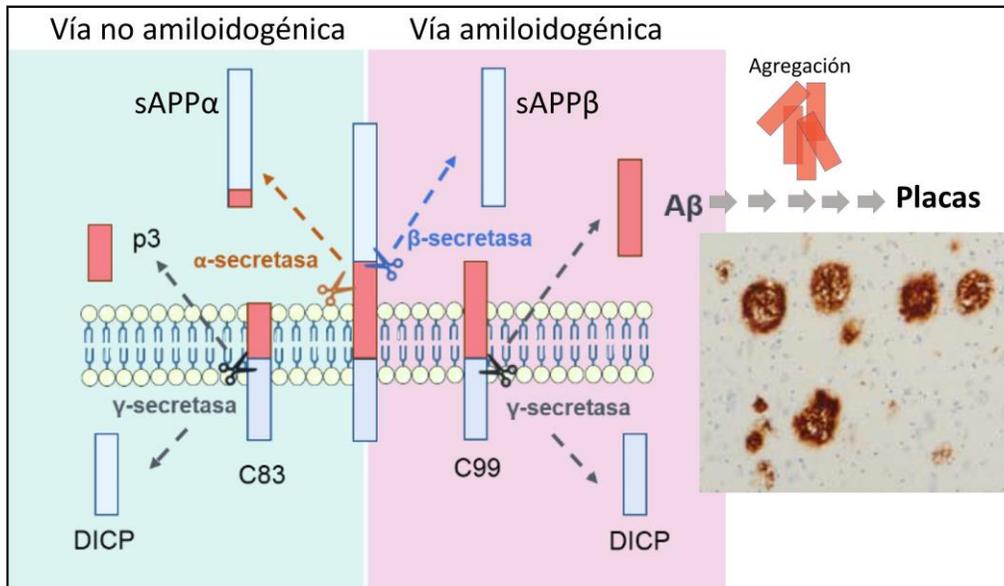


Figura 2: Representación esquemática del procesamiento de la APP y la consecuente formación de placas amiloides. Procesamiento no amiloidogénico (izquierda): La α -secretasa proteoliza a la APP liberando un fragmento soluble al espacio extracelular llamado sAPP α . A continuación, la γ -secretasa corta el fragmento que queda en la membrana liberando un dominio intracelular citosólico de APP (DICP) y otro extracelular (p3). Procesamiento amiloidogénico (derecha): La β -secretasa (BACE1) corta a la APP liberando el fragmento extracelular sAPP β , más corto que en el proceso no amiloidogénico. El extremo C-terminal es proteolizado ahora por el complejo γ -secretasa generando el péptido β A y DICP. La acumulación del péptido β A, de solubilidad limitada, formará auto agregados, que constituirán oligómeros, luego fibrillas y finalmente las placas seniles amiloides: fotografía del resultado de una inmunohistoquímica contra β A mostrando placas en el cerebro humano (adaptado de LaFerla et al., 2007 y de Serrano-Pozo et al., 2011))

Por otro lado, los ONF están compuestos por formas hiperfosforiladas de Tau, una proteína asociada a microtúbulos que normalmente estimula el ensamblaje de tubulina en microtúbulos en el cerebro. La actividad biológica de Tau está regulada por su nivel de fosforilación. Los sitios de fosforilación de Tau (Ser/Thr), se localizan principalmente en las regiones ricas en prolina (residuos 172-251) y en la cola C-terminal (residuos 368-441), que flanquean las repeticiones de unión a microtúbulos (**Fig. 3A**). La fosforilación anormal de la proteína Tau disminuye su afinidad por los microtúbulos, lo que conduce a la disociación de Tau y disminución de ensamblaje de microtúbulos (Fischer et al., 2009; Kiris et al., 2011; Sengupta et al., 1998). Adicionalmente, la fosforilación multisitio conduce a cambios conformacionales que hacen que la proteína Tau sea propensa al mal plegamiento y a la agregación (**Fig. 3B**), formando ONF (Alonso et al., 2001). Como se observa en la **figura 3A**, la proteína Tau puede ser fosforilada en muchos

residuos diferentes, y se ha descrito que la pseudofosforilación experimental de Tau en Ser199, Ser202, Thr205, Ser396 y Ser404 provoca la alteración de su típica conformación de clip y la inducción de una conformación patológica que puede ser más propensa a la agregación (Jeganathan et al., 2008). Por otro lado, se ha demostrado que sitios de fosforilación como Ser214, Ser262 y Ser305 inhiben la agregación de Tau y pueden ser neuroprotectoras (A. Schneider et al., 1999; Strang et al., 2019). En estadios tardíos de la enfermedad, la hiperfosforilación de múltiples sitios proagregación puede superar a los sitios protectores.

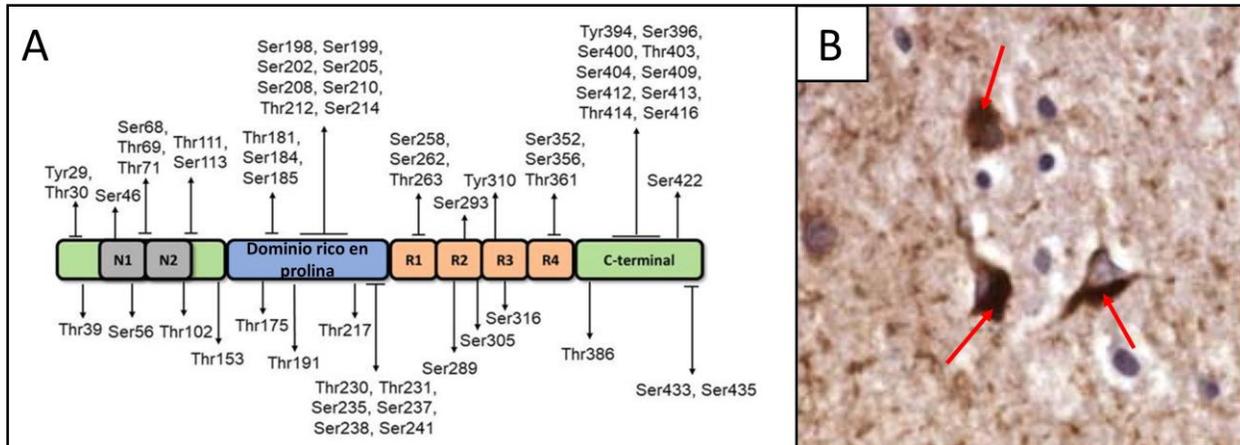


Figura 3: La hiperfosforilación de Tau causa la formación de ovillos neurofibrilares. Esquema de la isoforma de Tau más larga expresada en el cerebro humano (2N4R). La proteína Tau contiene importantes dominios estructurales, como el dominio N-terminal con inserciones N1 y N2, una región rica en prolina, cuatro repeticiones principales de unión a microtúbulos (R1-R4) y el dominio C-terminal. Se muestra la posición de los sitios de fosforilación identificados en los cerebros de EA; figura adaptada de (Xia et al., 2021) (A). Fotografía del resultado de una inmunohistoquímica contra Tau mostrando acumulación de ONF (flechas rojas) en el cerebro humano (adaptado de Serrano-Pozo et al., 2011) (B).

Como se mencionó previamente, la EA es una enfermedad progresiva. En los casos típicos, el depósito del péptido β A tiene un origen aparente en los lóbulos frontal y temporal, hipocampo y sistema límbico. Los ONF y la degeneración neurítica comienzan en los lóbulos temporales mediales y el hipocampo, y se extienden progresivamente a otras zonas del neocórtex (Fig. 4) (Masters et al., 2015).

Otra característica de los cerebros con EA, es la pérdida significativa de neuronas colinérgicas (Schliebs & Arendt, 2006) del núcleo basal de Meynert, una estructura que se encuentra en la base del prosencéfalo. De esta estructura emergen las mayores proyecciones colinérgicas a la corteza cerebral y el hipocampo. El sistema colinérgico está implicado en diversos procesos fisiológicos, pero también en importantes funciones cognitivas, tales como la atención, la memoria, y el aprendizaje (Drachman, 1977; Drachman & Leavitt, 1974; Fine et al., 1997). Estas funciones están mediadas por la unión del neurotransmisor acetilcolina (ACh), sintetizado en el citoplasma de las neuronas colinérgicas, a receptores muscarínicos y nicotínicos. Dado que en la EA los niveles de ACh y de la enzima que lo sintetiza, la colinacetiltransferasa, se encuentran disminuidos en esta patología, algunos de los enfoques farmacológicos actuales para ralentizar el avance de los síntomas cognitivos están enfocados en la recuperación de niveles normales de este neurotransmisor, como se detalla en la **sección 1.1.6**.

Finalmente, dentro de las características histopatológicas de la EA, cabe mencionar a la neuroinflamación como un proceso que ya no es un simple espectador activado por la aparición de placas amiloides y ONF, sino que contribuye tanto o más a la patogénesis que estos (Heneka et al., 2015). Los principales actores celulares de este proceso son la microglía y los astrocitos. Sin embargo, el término neuroinflamación es actualmente usado para describir diferentes procesos según el contexto, y es por eso que, tal como lo señalan recientemente Paolicelli et al., 2022 (Box 4 del artículo), se ha vuelto un término ambiguo y es recomendable usar términos precisos para describir fenómenos específicos. Es así que podemos mencionar que, en la EA, la reacción microglial, la astrogliosis reactiva, el aumento de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica y la consecuente infiltración de células inmunitarias periféricas, son fenómenos muy complejos que juegan un rol determinante en la pérdida de la homeostasis del sistema nervioso central (SNC). En particular, las células gliales se encuentran fuertemente reactivas a los alrededores de las placas amiloides (**Fig. 5A, B, C**).

1.1.4 Enfermedad de Alzheimer familiar y esporádica

Se han descrito dos formas de la EA, la familiar (EAF), con herencia autosómica dominante y poca influencia del entorno, y la esporádica (EAe) que no está asociada a un patrón mendeliano de herencia, y de la cual no se comprende exactamente la causa. Estas dos formas de la patología también pueden ser encontradas en bibliografía como EA de inicio temprano o de inicio tardío, respectivamente. A excepción de la edad de inicio, estas dos formas son clínica y fenotípicamente muy similares (Haass & Selkoe, 2022; Lippa et al., 1996).

1.1.4.1 Enfermedad de Alzheimer familiar

La prevalencia de esta forma hereditaria de la enfermedad es de menos del 5% del total de casos, los síntomas afectan a personas menores de 60 años y presenta una tasa de progresión más rápida que la EAe (Blennow et al., 2006; Harvey et al., 2003).

Como causas de EAF se han descrito hasta la fecha, más de 160 mutaciones en tres genes, los cuales codifican a la APP, en el cromosoma 21 (Goate et al., 1991), a la presenilina (PSN) 1, en el cromosoma 14, y a la PSN2, en el cromosoma 1 (Scheuner et al., 1996; Sherrington et al., 1995). Ambas PSNs son componentes esenciales de la γ -secretasa, enzima involucrada en el procesamiento de APP para la producción de péptidos amiloides. Las mutaciones que originan la EAF, promueven el aumento de la producción de péptidos β A más largos (de 42 y 43 residuos), en lugar del más común de 40 residuos, los cuales, como se mencionó anteriormente, son más hidrofóbicos y propensos a agregarse (Chávez-Gutiérrez et al., 2012; Szaruga et al., 2015).

1.1.4.2 Enfermedad de Alzheimer esporádica

Más del 95% de los casos reportados de EA corresponden a la forma esporádica, en la cual los síntomas aparecen después de los 70-75 años de edad. Al contrario que para la EAF, para la forma esporádica no se conoce la causa, pero se acepta que es una patología multifactorial, lo que significa que varios genes, junto con diversos factores ambientales, contribuyen al riesgo de padecerla (Blennow et al., 2006). El principal factor de riesgo para la EAe es la edad. Específicamente, en los Estados Unidos, el

porcentaje de personas de entre 65-74, 75-84 y mayores de 85 años con EA es del 5%, 13,1% y 33,3% respectivamente (Gaugler et al., 2023).

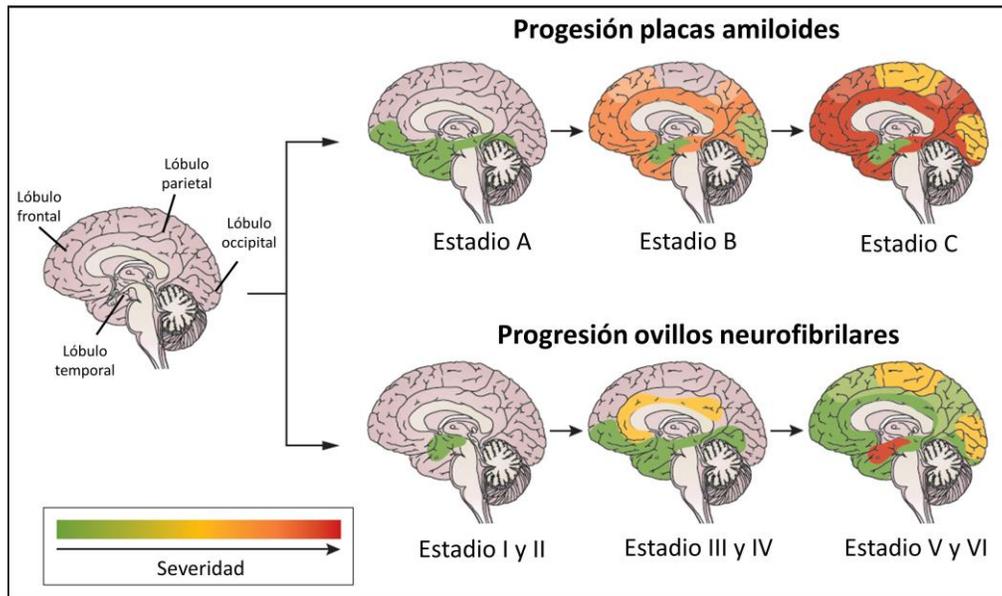


Figura 4: **Propagación de las placas amiloides y de la patología Tau en la EA.** Propagación de la patología amiloide (arriba) en la EA según los estadios de Thal y de la patología Tau según los estadios de Braak (abajo) (adaptado de Masters et al., 2015).

En cuanto a los factores de riesgo genéticos, actualmente se están investigando múltiples genes implicados en las vías relacionadas con la patología, pero el principal factor genético de riesgo es un alelo específico de la apolipoproteína E (ApoE). El gen *apoE* existe en tres alelos polimórficos diferentes ($\epsilon 2$, $\epsilon 3$ y $\epsilon 4$), y es la expresión del alelo $\epsilon 4$ el que aumenta entre 3 y 4 veces el riesgo de desarrollar esta enfermedad (Corder et al., 1993; Strittmatter et al., 1993). En el SNC, la ApoE es producida principalmente por los astrocitos para el transporte de colesterol hacia las neuronas (Bu, 2009), lo cual sugiere un rol importante de estas células en la EA. Aunque no está del todo claro, experimentos *in vitro* e *in vivo* indican que la ApoE4 podría ser menos eficiente para el transporte de colesterol y facilitar la formación de agregados amiloides. Por otro lado, el gen *trem2*, que en el SNC es expresado principalmente por la microglía, se perfila como otro factor de riesgo importante para la EA, lo cual también sitúa a las células microgliales en el centro del proceso de la enfermedad (Guerreiro et al., 2013; Jonsson et al., 2013). Trem2 es un receptor transmembrana que se activa por la unión de diversos ligandos como fosfolípidos, productos bacterianos y restos celulares, y la unión del receptor media la fagocitosis microglial y promueve cambios en el perfil de expresión de citoquinas (Cannon et al., 2012; Daws et al., 2003); por lo tanto la expresión de *trem2* mutado pareciera alterar el balance entre las respuestas proinflamatorias y la fagocitosis de las placas amiloides (Kleinberger et al., 2014).

Existen otros factores de riesgo para la EA que complejizan aún más esta patología, entre ellos se pueden nombrar a los factores de comorbilidad como la enfermedad cardiovascular (Pendlebury & Rothwell, 2009), la enfermedad cerebrovascular (Kuźma et al., 2018), la diabetes mellitus (DM) (Chatterjee et al., 2016; Logroscino et al., 2004; Ott et al., 1999; Rönnemaa et al., 2008; Yaffe et al., 2004), la depresión (Jorm, 2001), y el estilo de vida como la dieta (N. Hu et al., 2013) y el sedentarismo (Yan et

al., 2020). Además, el sexo femenino también se perfila como otro factor de riesgo, por una mayor incidencia de EA en las mujeres (L. L. Barnes et al., 2005; Beam et al., 2018; S. Gao et al., 1998; Gaugler et al., 2023) (ver **sección 1.3**).

1.1.5 Mecanismos patológicos de la enfermedad de Alzheimer

Existen diversas hipótesis que intentan explicar el origen de la EA, entre ellas:

- La **hipótesis de la cascada amiloide** o su variante más actualizada, la **hipótesis de los oligómeros β A**: postula que la deposición del péptido β A es un acontecimiento previo en la evolución de la EA, que conduce a la muerte celular y/o al desarrollo de ONF. La hipótesis de los oligómeros β A de pequeño peso molecular postula que estos representan agentes neurotóxicos que causan daño sináptico en la EA (**sección 1.1.5.1**).
- La **hipótesis de la propagación de Tau**: postula que los agregados de pTau se propagan induciendo así la progresión de la patología (**sección 1.1.5.2**)
- La **hipótesis metabólica**: postula que la resistencia a la insulina es el fenómeno que origina la EA (**sección 1.1.5.4**)
- La **hipótesis de la cascada mitocondrial**: postula que la disfunción mitocondrial relacionada con la edad conduce en última instancia a la patología y sintomatología de la EA (Swerdlow & Khan, 2004).
- La **hipótesis de la doble vía**: pretende resolver la desconexión entre la patología amiloide y Tau y explorar los factores desencadenantes previos de la enfermedad en la EAe, y por tanto postula que podría haber factores anteriores capaces de impulsar la patología amiloide y de Tau (Small & Duff, 2008).
- La **hipótesis colinérgica**: postula que la degeneración de las neuronas colinérgicas de los núcleos basales del prosencéfalo provoca alteraciones en terminales colinérgicas presinápticas en el hipocampo y el neocórtex, lo que es importante para la memoria y otros síntomas cognitivos (A. V. Terry & Buccafusco, 2003).
- La **hipótesis de la reentrada en el ciclo celular**: postula que un aumento del daño en el ADN de las neuronas relacionado con la edad es responsable de las enfermedades neurodegenerativas (Chow & Herrup, 2015).
- La **hipótesis vascular**: propone que el daño vascular (desorganización y reducción de la red capilar y vascular) observado en la EA origina sitios potenciales para los depósitos β A y afecta su eliminación (Marchesi, 2011).

Cada una de estas hipótesis presenta evidencia a favor de la misma, pero lo que es difícil de determinar en todas ellas es la primacía del efecto. En esta sección se introducirán en detalle las hipótesis de la cascada amiloide, de Tau y metabólica, las dos primeras por ser las más difundidas en el campo, y la última por relevancia con el tema y los objetivos del trabajo. Adicionalmente se dará lugar al rol de las células gliales en la patogénia de la enfermedad, el cual es cada vez más reconocido en el área.

1.1.5.1 Hipótesis de la cascada amiloide

La hipótesis de la cascada amiloide fue expuesta en 1992 por Hardy y Higgins (Hardy & Higgins, 1992), proponiendo que la deposición del péptido β A es la causa principal de la neurodegeneración observada en la EA. Más específicamente, la acumulación anormal del péptido β A genera una respuesta inflamatoria (en la que participan la microglía y los astrocitos, e incluso el sistema inmunitario periférico), especialmente alrededor de las placas. Este fenómeno modula la homeostasis celular, altera las sinapsis, provoca estrés oxidativo y conduce progresivamente a la patología Tau. Todos estos mecanismos conducen a la disfunción y muerte neuronal, causando los déficits cognitivos observados en pacientes.

Esta hipótesis se ve respaldada por la existencia de la forma familiar de la EA, ya que todas las mutaciones descritas se localizan en proteínas implicadas en el metabolismo de APP y la producción del péptido β A, y son suficientes para generar EA. Además, la neuropatología de la EA se observa invariablemente en el síndrome de Down (MANN et al., 1984; Motte & Williams, 1989), lo cual es explicado por la trisomía del cromosoma 21, que da como resultado una mayor expresión de APP y de los consiguientes niveles más altos del péptido β A durante toda la vida. Por otra parte, como se mencionó previamente, el principal factor de riesgo genético para la EA es la ApoE4, y existen pruebas que la ApoE es necesaria para la deposición amiloide (Bales et al., 1999; Holtzman et al., 2000).

Sin embargo, esta hipótesis, como todas, es actualmente discutida en el campo. La discusión no trata sobre que β A no esté implicado en la EA, que junto con la APP y las secretasas debe seguir siendo una parte central de nuestro pensamiento sobre la fisiopatología de la enfermedad, sino se trata de discutir que una simple vía lineal que traza la progresión de la enfermedad resulta incompleta como hipótesis formal, debido a todas las causas que pueden estar implicadas en promover la neurodegeneración y de las cuales hay evidencia a favor en el contexto de la EA (Herrup, 2015). La discusión emerge de las observaciones de que el número de placas amiloides no se correlaciona bien con la gravedad de la demencia (figura 7 de Masters et al., 2015; McLean et al., 1999; R. D. Terry et al., 1991), aunque si lo hacen los niveles de β A solubles (Lue et al., 1999; McLean et al., 1999) y es de esta observación que se desprende la hipótesis de los oligómeros β A. En efecto, la presencia de placas amiloides en individuos sin deterioro cognitivo sugiere que las placas amiloides no son la única causa de los déficits cognitivos (Klunk et al., 2009). Por otra parte, durante muchos años hubo una importante falta de traslación de la ciencia preclínica a la clínica, ya que diversas estrategias terapéuticas contra la patología amiloide, como inhibidores de las secretasas β o γ , y anticuerpos monoclonales anti-péptido β A, fallaron en mejorar los síntomas cognitivos de los pacientes, muchas veces con efectos secundarios adversos adicionales (Haass & Selkoe, 2022; Mehta et al., 2017). Sin embargo, muy recientemente algunos ensayos clínicos de fase 3 de terapias anti-amiloides mostraron resultados prometedores (Yadollahikholes & Rojas, 2023). Aunque las terapias anti-amiloides son la línea principal de investigación clínica en la terapéutica de la EA, la visión neuronocéntrica debe ampliarse a otra que tenga en cuenta la contribución de los distintos tipos de células, sus interacciones mutuas y la evolución gradual de la enfermedad.

1.1.5.2 Hipótesis de la propagación de Tau

Aunque las alteraciones relacionadas al péptido β A son claramente un eslabón importante en la cadena de eventos patológicos de la EA, la forma patológica de la proteína Tau se correlaciona mejor con los déficits cognitivos asociados a la enfermedad. La progresión de la patología Tau en diferentes regiones cerebrales durante el curso de la enfermedad, desde muy tempranas etapas, fue descrita por Braak &

Braak, 1991. Existen seis etapas de Braak en la EA, como se observa en la **figura 4, abajo**. Estas etapas progresivas se correlacionan bien con el deterioro cognitivo observado en la EA, en contraste con la patología amiloide (Masters et al., 2015). Como se mencionó previamente, en condiciones fisiológicas, la proteína Tau promueve el ensamblaje y el mantenimiento de los microtúbulos, función que se encuentra comprometida por un desbalance en su estado de fosforilación. En la EA, la patología Tau altera el citoesqueleto y conduce a la neurodegeneración axonal y dendrítica de las neuronas afectadas (Grundke-Iqbal et al., 1986). Hipótesis recientes sugieren una propagación trans-sináptica de agregados, induciendo así la progresión de la patología (L. Liu et al., 2012; Y. Wang et al., 2017). Estos descubrimientos generaron el desarrollo de terapias contra Tau, entre ellas inhibidores de la agregación de Tau, inhibidores de quinasas de Tau, y estabilizadores de microtúbulos. Sin embargo, la mayoría de ellas fueron discontinuadas por efectos adversos o falta de eficacia. Actualmente, la mayoría de los enfoques dirigidos a Tau que se encuentran en ensayos clínicos son inmunoterapias (Congdon & Sigurdsson, 2018). Debido a que la hipótesis de la propagación de Tau tiene menos antigüedad que la hipótesis amiloide (Frost et al., 2009 vs. primer versión de la cascada amiloide en 1992), las inmunoterapias contra Tau son más recientes y su eficacia queda por comprobar en el futuro.

1.1.5.3 Rol de las células gliales

Durante el siglo pasado y principios del presente, las hipótesis amiloide y de propagación de Tau dominaron el campo de estudio, centrando la mayor parte de las investigaciones en las neuronas, difícilmente teniendo en cuenta todos los tipos celulares implicados en la EA. Sin embargo, actualmente es reconocido que la microglía y los astrocitos juegan un rol fundamental en la patogenia de la EA, ya no solo como meros actores secundarios, sino también como actores primarios del desarrollo de la enfermedad, como se detallará a continuación. Por otra parte, últimamente cada vez más evidencia emerge acerca de la implicancia de los oligodendrocitos en la EA (Blanchard et al., 2022; J. F. Chen et al., 2021; Depp et al., 2022), aunque no se ahondará sobre este tema en este trabajo.

Microglía

La microglía son los macrófagos residentes del SNC, es decir las principales células que componen el sistema inmune del cerebro (Ransohoff & Perry, 2009). Son la población más dinámica del cerebro adulto, se encuentran explorando continuamente el entorno a través de sus numerosas prolongaciones ramificadas. Incluso en el cerebro sano, estas células se encuentran constantemente retrayendo y extendiendo sus prolongaciones, y responden rápidamente a las alteraciones de su entorno (Davalos et al., 2005; Nimmerjahn et al., 2005). De esta forma, la microglía está en íntimo contacto con células de su entorno inmediato, y expresa un conjunto de receptores de superficie que les permiten detectar cambios en su entorno. Los estados microgliales son, por tanto, dinámicos, y cambios en el epigenoma, transcriptoma, proteoma y metaboloma de la célula producen resultados morfológicos, ultraestructurales y/o funcionales discretos (Paolicelli et al., 2022). La microglía se encuentra implicada en muchas funciones críticas del SNC, como la remodelación de las sinapsis, la eliminación de células y desechos apoptóticos, la promoción de la mielinización y liberación de factores solubles que modulan la actividad neuronal (Borst et al., 2021).

En condiciones de estrés, ya sea por invasión de un patógeno, injuria o acumulación anormal de proteínas, las células gliales cambian su morfología desde un fenotipo altamente ramificado con soma pequeño (**Fig. 5D, E**) hacia un fenotipo ameboide caracterizado por presencia de un cuerpo celular más esférico, hipertrofia nuclear, retraimiento de sus procesos (**Fig. 5F, G**) y expresión/liberación de factores y proteínas (Colonna & Butovsky, 2017; Doorn et al., 2014). En la EA, la microglía reactiva se posiciona alrededor de las placas amiloides (McGEER et al., 1988; Vehmas et al., 2003), aunque aún no se conoce con exactitud su función alrededor de ellas.

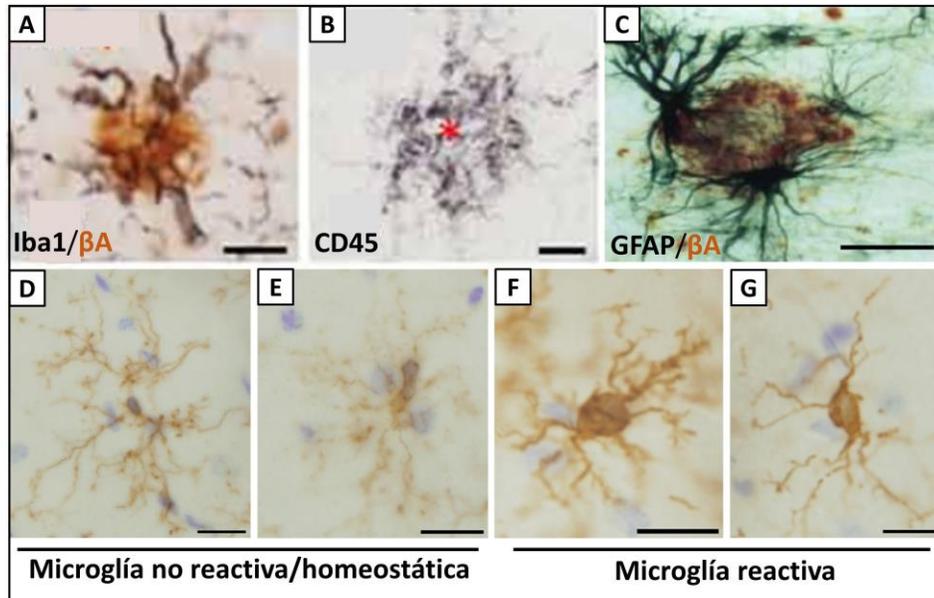


Figura 5: Células gliales reactivas alrededor de placas seniles y cambios morfológicos de la microglía frente a injuria. Detección inmunohistoquímica de células microgliales positivas para Iba1 (**A**) y CD45 (**B**) alrededor de placas amiloides (β A) en cerebros humanos con EA estadiada como Braak IV. El asterisco indica placa amiloide. Barra de escala: 20 μ m (adaptado de Navarro et al., 2018). Detección inmunohistoquímica de células astrogliales positivas para GFAP alrededor de una placa amiloide en cerebro humano con EA. Barra de escala: 50 μ m (adaptado de Pike et al., 1995) (**C**). Células microgliales positivas para Iba1: en cerebro de rata adulta control se observan células con soma pequeño, altamente ramificadas y con procesos finos, correspondiente a microglía no reactiva u homeostática (**D, E**); en cerebro de rata modelo de EA se observan células con soma prominente, inmunomarcado fuertemente para Iba1, procesos retraídos y engrosados (**F, G**). Barra de escala (**D-G**): 15 μ m

La reacción de la microglía implica cambios funcionales, con ganancia o pérdida de función. Por ejemplo, estudios han revelado que la deposición del péptido β A coincide con el deterioro funcional de la microglía, lo que sugiere que, en estadios patológicos avanzados, la microglía se vuelve incapaz de eliminar y limpiar la carga amiloide (Hickman et al., 2008; Krabbe et al., 2013). Si bien el mecanismo por el cual esto sucede no se conoce del todo, utilizando ratones transgénicos modelo de la EA (APP/PS1) y *knock out* (KO) para el inflammasoma NLRP3 (componente crítico del sistema de inmunidad innata), se observó que la activación del mismo afecta negativamente la funcionalidad de la microglía con respecto a la eliminación de las placas amiloides (Heneka et al., 2013).

La microglía también se encarga del remodelamiento de las sinapsis mediante fagocitosis (Paolicelli et al., 2011; Schafer et al., 2012). La pérdida de sinapsis observada en la EA (Scheff & Price, 2006; Terry et al., 1991) puede estar mediada por la fagocitosis en respuesta a los agregados β A, o la liberación de

factores tóxicos para las sinapsis (Rajendran & Paolicelli, 2018). Por otra parte, la reacción de la microglía a distintos tipos de injuria cerebral promueve la liberación de mediadores inflamatorios resultando en la producción de TNF α , IL1 β y otras citoquinas inflamatorias que vez promueven la reactividad de los astrocitos (Liddel et al., 2017).

Astroцитos

Los astrocitos constituyen una población de células gliales altamente heterogénea (**Fig. 6A, B**) (Ben Haim & Rowitch, 2016; Emsley & Macklis, 2006; Endo et al., 2022; Karpf et al., 2022), implicada en diversas funciones cruciales en el SNC. Estas células se encuentran por un lado en contacto con los vasos sanguíneos (**Fig. 6C**) y por otro con las sinapsis (**Fig. 6D**), lo que les permite regular los intercambios con el torrente sanguíneo a través de la barrera hematoencefálica (BHE) y participar activamente en la transmisión sináptica, regulando la homeostasis del fluido intersticial, reciclando neurotransmisores y liberando gliotransmisores (Sofroniew & Vinters, 2010). Adicionalmente, los astrocitos regulan el metabolismo energético y almacenan glucógeno, son importantes para la defensa contra especies reactivas del oxígeno (ROS) y tienen un rol muy importante durante el desarrollo ya que modulan la formación y función de las sinapsis (Sofroniew & Vinters, 2010). Aunque las funciones de apoyo de los astrocitos están bien reconocidas, sus efectos directos sobre la actividad neuronal siguen siendo imprecisos. Sin embargo, cada vez hay más evidencia de que los astrocitos están implicados en procesos complejos como la memoria (Adamsky et al., 2018; Panatier et al., 2006).

Al igual que la microglía, los astrocitos son capaces de responder a cualquier cambio en la homeostasis del SNC, y en el siglo XXI, se considera cada vez más que contribuyen de forma decisiva a los trastornos neurológicos. En condiciones patológicas, agudas o neurodegenerativas, los astrocitos se vuelven reactivos. La "astrogliosis reactiva" o la "reactividad astrocítica" es el proceso por el cual, en respuesta a la patología, los astrocitos se comprometen en programas definidos molecularmente que implican cambios en la regulación transcripcional, así como remodelación bioquímica, morfológica, metabólica y fisiológica, que en última instancia resultan en la ganancia de nuevas funciones o la pérdida de sus funciones homeostáticas (Escartin et al., 2021). La astrogliosis reactiva es comúnmente identificada mediante cambios en el citoesqueleto ocasionado por un aumento de la expresión de ciertas proteínas de filamentos intermedios como la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) (BIGNAMI & DAHL, 1976) (**Fig. 6E, F**), vimentina (Yamada et al., 1992) y nestina (Moreels et al., 2008), que promueve cambios morfológicos incluyendo hipertrofia del soma y de los procesos primarios (**Fig. 6E, F**) (Bardehle et al., 2013).

Sin embargo, la reacción de los astrocitos a los distintos cambios en el SNC no es una respuesta homogénea. Por ejemplo, se ha observado que, aunque muchos genes son comúnmente expresados entre dos contextos patológicos dados (inyección de lipolisacárido (LPS) o isquemia), al menos el 50% de la expresión génica alterada es específica de un determinado tipo de lesión (Zamanian et al., 2012). Por otro lado, tras una injuria aguda en la corteza cerebral, se reportó que, aunque todos los astrocitos se volvieron hipertróficos, solo algunos permanecieron estáticos, otros polarizaron hacia la lesión y algunos proliferaron (Bardehle et al., 2013).

Las vías de señalización principales que conducen a la reactividad astrocítica son: la vía de NF- κ B (factor nuclear kappa B), la vía MAPK (proteína quinasa activada por mitógenos), la vía NFAT (factor nuclear de células T activadas)/Calcineurina y la vía JAK2/STAT3 (quinasa Janus 2/transductor de señales y activador de la transcripción 3) (Haim, Carrillo-de Sauvage, et al., 2015).

La vía JAK2/STAT3 es una cascada ubicua que regula la expresión de genes implicados en muchas funciones, como el crecimiento, la proliferación, la diferenciación y la inflamación celular. Esta vía es activada por citoquinas y factores de crecimiento como la interleuquina (IL) 6 y el factor neurotrófico ciliar (CNTF). La unión del ligando a su receptor conduce a la aposición y transfosforilación de las JAK en residuos de tirosina, liberando su actividad catalítica intrínseca. De esta manera, el receptor también es fosforilado, generando sitios de unión para el dominio SH2 (del inglés *Src Homology 2*), de STAT3. Tras su fosforilación, STAT3 dimeriza e ingresa al núcleo de la célula donde promueve la transcripción génica (**Fig. 7**) (Levy & Darnell, 2002). Se ha observado que STAT3 se acumula en el núcleo de los astrocitos reactivos en el hipocampo de modelos de ratones transgénicos de EA, y en el cuerpo estriado de modelos murinos y primates de enfermedad de Huntington (Haim, Ceyzériat, et al., 2015). La activación de la vía STAT3 parece ser una característica universal de la reactividad de los astrocitos en modelos de enfermedades neurodegenerativas (Haim, Ceyzériat, et al., 2015).

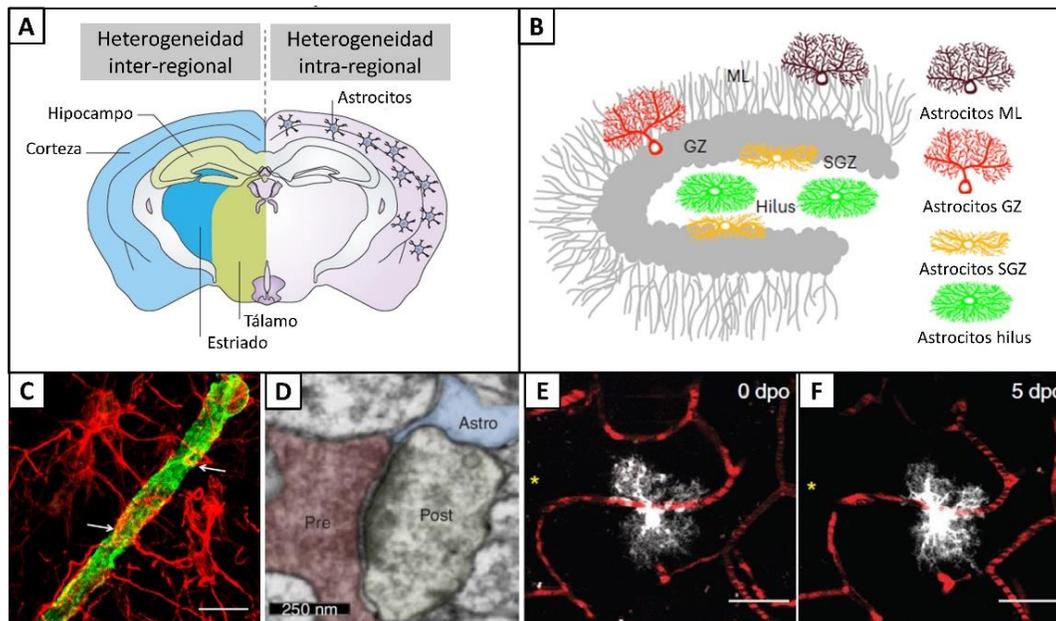


Figura 6: Principales características de los astrocitos. Esquema sobre la heterogeneidad astrocítica, mostrando diferencias tanto entre regiones cerebrales (heterogeneidad inter-regional) como en la misma región (heterogeneidad intra-regional); por ejemplo, los astrocitos adyacentes en una región cerebral determinada muestran diversidad en su expresión de proteínas específicas y en su capacidad funcional para regular la actividad de subtipos neuronales (adaptado de Ben Haim & Rowitch, 2016) (A). Esquema que ilustra la población de astrocitos morfológicamente distinta en diferentes regiones el giro dentado (GD) del hipocampo: capa molecular (ML), zona o capa granular (GZ), zona subgranular (SGZ) e Hilus (adaptado de Karpf et al., 2022) (B). Imagen confocal de tinción inmunofluorescente de un vaso sanguíneo con anti-colágeno IV (verde), y astrocitos con anti-GFAP (rojo); el color amarillo/naranja indicado con flechas muestra el recubrimiento del vaso por los procesos celulares. Barra de escala: 10 μ m (adaptado de Rajkowska et al., 2013) (C). Imagen de microscopía electrónica de la corteza cerebral de ratón, mostrando un proceso astrocítico contactando sinapsis y formando la sinapsis tripartita (adaptado de Chung et al., 2015) (D). Microscopía *in vivo* de la respuesta de un astrocito de ratón a una herida en la corteza cerebral: ejemplo de una célula que a los 5 días post-operación (dpo) (F) se volvió hipertrófica en comparación al dpo 0 (E), pero que esencialmente conservó su morfología inicial y mantuvo su posición. Barra de escala: 50 μ m (adaptado de Bardehle et al., 2013).

En la EA, muchas funciones de los astrocitos se ven modificadas por la reactividad. Por ejemplo, se observan alterados la homeostasis del glutamato, el metabolismo de la glucosa y la expresión de enzimas

mitocondriales claves para la glucólisis, la producción de ROS, y la expresión de las conexinas que forman las juntas gap entre los astrocitos. También, se observan alteraciones en la homeostasis del calcio, y alteraciones en el Sc de los astrocitos (liberaciones de citoquinas, factores tróficos y gliotransmisores) (Haim, Carrillo-de Sauvage, et al., 2015), por lo que la respuesta de estas células juega un rol fundamental en la patología de la EA.

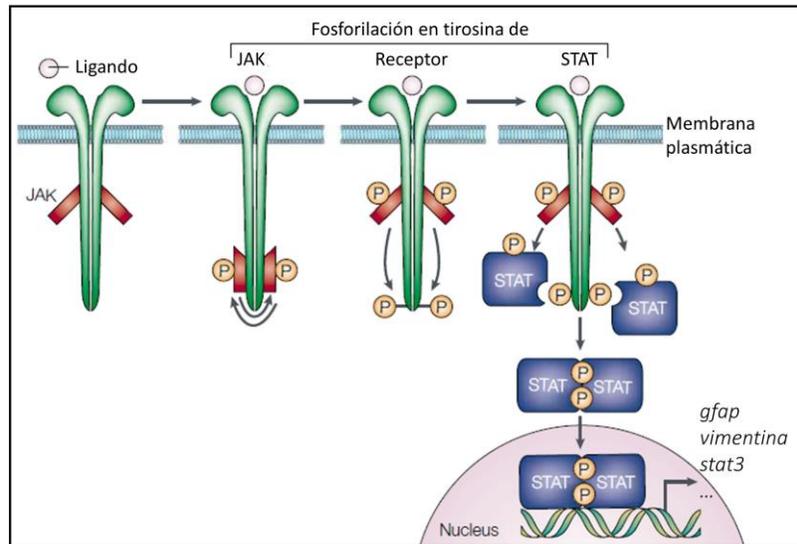


Figura 7: Vía de señalización canónica de JAK/STAT3. Fosforilaciones secuenciales de tirosina desencadenadas por la interacción ligando-receptor. La dimerización del receptor permite la transfosforilación y activación de las quinasas Janus (JAK). A continuación, se produce la fosforilación de las colas del receptor y el reclutamiento de las proteínas transductoras de señales y activadoras de la transcripción (STAT). Luego se produce la fosforilación de STAT. A la dimerización de STAT activada (fosforilada en tirosina) le sigue la entrada en el núcleo (adaptado Levy & Darnell, 2002).

1.1.5.4 La enfermedad de Alzheimer, ¿una enfermedad metabólica?

La hipótesis del metabolismo tiene su origen en los trabajos de Hoyer y sus colegas, que describieron una reducción en la utilización de glucosa y la producción de energía en el cerebro de personas con EA (Hoyer, 1991; Hoyer et al., 1988). Durante las últimas décadas, se ha demostrado que en el cerebro, la señalización de la insulina y el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF1) están alteradas. Por ejemplo, los transcritos de ARNm para las proteínas clave de sus vías de señalización, están disminuidos en múltiples regiones cerebrales en la EA (Steen et al., 2005; Talbot et al., 2012). Por otra parte, tanto en las neuronas hipocámpales expuestas a oligómeros βA *in vitro*, como en estudios *post-mortem* utilizando tejido cerebral de la EA, los receptores de insulina se observaron redistribuidos de su ubicación habitual en la membrana plasmática dendrítica, al soma neuronal (De Felice et al., 2009; Moloney et al., 2010).

Como se mencionó previamente, está bien descrito que el riesgo de demencia es significativamente mayor para los pacientes con DM tipo II frente a individuos no diabéticos (Chatterjee et al., 2016; Logroscino et al., 2004; Ott et al., 1999; Rönnemaa et al., 2008; Yaffe et al., 2004). Además, se observó que un control glucémico alterado, revelado por niveles elevados de hemoglobina glucosilada en plasma, se correlaciona con el deterioro cognitivo incluso en individuos no diabéticos, lo que sugiere que la desregulación de la glucosa por sí sola puede desencadenar el deterioro cognitivo (Ravona-Springer et al., 2012).

De esta manera, se ha propuesto que las anomalías metabólicas presentes en la EA se originan por una resistencia a insulina y al IGF1 en el cerebro, que causan una ruptura en las vías de señalización que regulan la supervivencia, la producción de energía, la expresión génica, y la plasticidad neuronal (vía de señalización descrita en **sección 1.4.1.1**). Además, estudios demuestran una conexión entre la señalización de insulina y la patología amiloide y Tau típicas de la EA. Por ejemplo, en cultivos primarios de neuronas hipocampales se observó que la activación del receptor de insulina protege a las neuronas de los efectos tóxicos de la incubación con oligómeros βA , ya que impiden que estos se unan a las sinapsis (De Felice et al., 2009). Por otro lado, la señalización de insulina puede alterar el nivel de fosforilación de Tau, ya que una de las quinasas involucradas en esta acción es la glucógeno sintasa quinasa-3 β (GSK3 β), que es negativamente regulada por insulina (Sperber et al., 1995; H. Zhu et al., 2018).

La insulina y el IGF1 periféricos cruzan la BHE y los plexos coroideos que conforman la barrera sangrelíquido cefalorraquídeo (LCR) (Banks, 2004; Carro et al., 2005; Pan & Kastin, 2000), y se unen a receptores que se expresan en prácticamente todo el cerebro, incluyendo áreas centrales para la memoria y la cognición, como el hipocampo y la corteza prefrontal (Banks, 2004; Havrankova et al., 1978; Unger et al., 1989). Sin embargo, existe un debate abierto sobre la acción de la insulina en el control del metabolismo cerebral de la glucosa. Aunque algunos pocos trabajos, dados por estudios en astrocitos KO de su receptor (García-Cáceres et al., 2016) o por PET en pacientes con deterioro en la tolerancia a la glucosa (Hirvonen et al., 2011) muestran que la insulina podría tener un rol en regular el azúcar, en general se cree que la insulina en el cerebro no tiene el mismo impacto que en la periferia, donde es bien sabido que regula el consumo de la glucosa. En cambio, diversos estudios le otorgan a la insulina un rol neuromodulador, ya que es importante para la plasticidad sináptica y los procesos relacionados con la memoria, incluida la modulación de la densidad de las espinas dendríticas, la formación y transmisión sináptica y la potenciación a largo plazo (Blázquez et al., 2014; C. C. Lee et al., 2011; McNay et al., 2010; Stranahan et al., 2008; Y. Zhang et al., 2016). De hecho, una serie de pequeños experimentos clínicos en los que la insulina se ha administrado por vía intranasal directamente en el cerebro, han obtenido resultados prometedores (Craft et al., 2003, 2012). Sin embargo, esto llevó a un ensayo clínico mucho más grande (con 240 participantes) finalizado en 2018, en el cual no se observaron beneficios cognitivos o funcionales por el tratamiento con insulina intranasal (ClinicalTrials.gov Identificador: NCT01767909).

Si las anomalías de la señalización de la insulina forman parte de la causalidad de la enfermedad o si se ven afectadas negativamente debido al propio proceso de la EA, es una pregunta que aún permanece abierta (Stanley et al., 2016).

1.1.6 Tratamiento para la enfermedad de Alzheimer

El tratamiento de una persona con EA es puramente sintomático y de apoyo. En la actualidad, existen tratamientos farmacológicos que se dividen principalmente en dos categorías: los inhibidores de la acetilcolinesterasa, entre los cuales tenemos al donepezilo, galantamina y rivastigmina, y el antagonista no competitivo del receptor del ácido N-metil-D-aspartico (NMDA), representado por la memantina. El objetivo de los inhibidores de acetilcolinesterasa es promover la neurotransmisión colinérgica, limitando la degradación del neurotransmisor acetilcolina, deficiente en la EA, como se mencionó previamente. Por su parte, la memantina, bloquea la hiperactividad de los receptores NMDA observada en los pacientes, sin bloquear su actividad normal, evitando así la excitotoxicidad del glutamato (Nyakas et al., 2011).

Sin embargo, como reguladores de los neurotransmisores, estos fármacos sólo pueden aliviar los síntomas temporalmente y no pueden retrasar la progresión de la EA. Estos medicamentos suelen ser bien tolerados por los pacientes y tienen efectos secundarios que se limitan principalmente a trastornos gastrointestinales (náuseas, vómitos y diarrea). Estos efectos secundarios suelen reducirse iniciando el tratamiento con dosis bajas, aumentándolas gradualmente (Blennow et al., 2006). Aunque su eficacia y beneficios sobre la cognición y el estado global están establecidos, sus efectos sobre la cognición y el estado global de los pacientes sigue siendo moderado (Raina et al., 2008).

1.2 Modelos murinos de la enfermedad de Alzheimer

Se están realizando grandes esfuerzos para desarrollar modelos animales de EA con el fin de comprender mejor la fisiopatología de la enfermedad, así como para identificar modelos adecuados para investigar posibles terapias. La mayoría son modelos de ratones transgénicos (197 modelos descritos actualmente, según Alzforum.org), que con sus modificaciones genéticas permiten simular la patología amiloide y Tau, solas o combinadas.

1.2.1 Ratones transgénicos

Basándose en los hallazgos genéticos de que casi todas las mutaciones ligadas a EA están asociadas a alteraciones de la producción/agregación del péptido β A, los avances en la tecnología de ingeniería genética han permitido el desarrollo de ratones modelo que utilizan los genes *app*, *ps1* o *ps2*. Para combinarlo con la patología Tau, existen variantes con modificaciones en el gen *mapt*. Muy recientemente, se empezaron a producir variantes que involucran modificaciones en los genes de *apoE* y *trem2*. Si bien algunos ratones modelo han sido ampliamente utilizados en muchos estudios para aclarar el proceso patológico de la EA, como todo modelo, presentan sus limitaciones. Principalmente, las mutaciones relacionadas con la patología amiloide representan sólo el 5% de las formas de EA. Además, la mayoría de ellos no desarrollan pérdida neuronal ni atrofia cerebral y la progresión de placas u ONF, estereotipada en humanos, no se reproduce en los modelos transgénicos (Duyckaerts et al., 2008). No obstante, estos modelos de ratones transgénicos tienen la ventaja de desarrollar una o ambas patologías (amiloide y Tau), lo que permite realizar estudios en un contexto específico. También muestran la glía reactiva, alteraciones sinápticas y déficits conductuales, principalmente de memoria y aprendizaje, que pueden asemejarse a los observados en pacientes. Por lo tanto, cada modelo debe elegirse específicamente en función de la cuestión estudiada.

1.2.2 El modelo de estreptozotocina intracerebroventricular en rata: modelo de enfermedad de Alzheimer esporádica

En base a lo descrito en la **sección 1.1.5.4** sobre la hipótesis metabólica, se ha desarrollado un modelo farmacológico en rata para inducir disfunción del sistema insulínico cerebral, basado en la inyección intracerebroventricular (icv) de una droga diabotogénica llamada estreptozotocina (STZ). La STZ (una glucosamina derivada de nitrosurea) es una droga tóxica que causa alquilación del ADN, de estructura similar a la glucosa, lo cual facilita su acceso a las células a través del transportador de glucosa de tipo 2 (GLUT2) (Elsner et al., 2000). Al ser administrada por vía intraperitoneal (ip), es usada para generar modelos de diabetes, ya que presenta toxicidad selectiva para las células β pancreáticas debido a la

elevada expresión de GLUT2, e induce DM insulino-dependiente (tipo I) o DM tipo II en función de las dosis inyectadas (Elsner et al., 2000; Szkudelski, 2001). Sin embargo, para generar un modelo de EA, la STZ debe ser administrada en los ventrículos laterales en dosis mucho más bajas (entre 1 y 3 mg/kg), y si bien no altera los niveles plasmáticos de glucosa ni induce DM (Agrawal et al., 2011; Lester-Coll et al., 2006; Pathan et al., 2006), altera el metabolismo cerebral de la glucosa (Pathan et al., 2006) y el metabolismo energético, disminuyendo los niveles de moléculas de alta energía como ATP, GTP y creatina fosfato (Lannert & Hoyer, 1998). Con más detalle, Duelli y colaboradores mostraron que seis semanas después de la inyección icv de STZ, hay una alteración severa en la utilización de glucosa y disminución del metabolismo energético en 17 de 35 regiones cerebrales evaluadas, en particular, la corteza frontal, parietal, somatomotora, auditiva y entorrinal, y los subcampos del hipocampo (Duelli et al., 1994). Además, se demostró que la inyección icv de STZ reduce drásticamente la actividad de enzimas de la vía glucolítica en la corteza y en el hipocampo (Plaschke & Hoyer, 1993). La STZ también disminuye la expresión y la densidad de los receptores de insulina (RI) en el cerebro, y descompensa la vía de señalización de esta hormona al alterar el balance de la fosforilación de las proteínas intervinientes (Agrawal et al., 2011; Grünblatt et al., 2007; Salkovic-Petrisic et al., 2006).

La inyección icv de STZ es considerada por muchos autores como un modelo de la EAe (modelo STZ-icv). Precisamente, el modelo se caracteriza por déficit de memoria (Agrawal et al., 2011; Bassani et al., 2018; Grünblatt et al., 2007; Lannert & Hoyer, 1998; Shoham et al., 2003, 2007) aunque también se observan alteraciones en otros patrones de comportamiento, como en la ansiedad (Veerendra Kumar & Gupta, 2003; L. Zhu et al., 2019). A nivel celular, se observan los ya mencionados trastornos en la utilización de la glucosa, aumento de la actividad y expresión de la acetilcolinesterasa (Agrawal et al., 2010; Biswas et al., 2018; Deshmukh et al., 2016), estrés oxidativo (Agrawal et al., 2010; Ishrat et al., 2009; Pathan et al., 2006; Veerendra Kumar & Gupta, 2003) y neurodegeneración (Biswas et al., 2018; Kraska et al., 2012; Lester-Coll et al., 2006; Shoham et al., 2003). Estas alteraciones ocurren algunas semanas después de la inyección y perduran por períodos indeterminados. Además, el modelo presenta un aumento de la fosforilación de la proteína Tau en diversas regiones en el cerebro de rata (Biswas et al., 2018; Grünblatt et al., 2007; L. Zhu et al., 2019), aumento de la expresión del péptido β A (Biswas et al., 2018; Lester-Coll et al., 2006; Salkovic-Petrisic et al., 2011; T. de O. Santos et al., 2012) e incluso se ha descrito la formación de placas seniles en el hipocampo y la corteza (Afshar et al., 2018; Knezovic et al., 2015; Paidi et al., 2015). Las células gliales también se encuentran reactivas en el modelo de la STZ-icv (Bassani et al., 2018; Shoham et al., 2003; L. Zhu et al., 2019).

1.3 Diferencias sexuales en neurociencia

Las diferencias sexuales, además de verse reflejadas en comportamientos reproductivos distintos, influyen significativamente en la anatomía y bioquímica del cerebro y generan diversos procesos psicológicos y cognitivos. Por ejemplo, amplias zonas del manto cortical son significativamente más gruesas en las mujeres que en los hombres (Luders et al., 2006) y las proporciones de materia gris y blanca también difieren significativamente entre sexos en diversas regiones de la corteza (Allen et al., 2003). La arquitectura estructural del cerebro humano también difiere según el sexo, ya que se ha demostrado que los cerebros masculinos están estructurados para facilitar la conectividad dentro de los lóbulos y dentro

de los hemisferios, mientras que los cerebros femeninos tienen una mayor conectividad interhemisférica (Ingalhalikar et al., 2014). Estas diferencias de conectividad podrían explicar en parte, las diferencias sexuales respecto a ciertas características, con las mujeres superando a los hombres en pruebas de atención, memoria de palabras y rostros, y cognición social, y los hombres obteniendo mejores resultados en procesamiento espacial y velocidad motora y sensoriomotora (Gur et al., 2012; Ingalhalikar et al., 2014).

Actualmente se concibe que las diferencias sexuales en la estructura cerebral no son únicamente consecuencia del sexo genético (XX versus XY) y la diferenciación de las gónadas, sino que son el resultado de una interacción de factores biológicos y ambientales. Entre estos factores están además de los cromosomas sexuales, las señales que actúan directamente sobre las células cerebrales para provocar la diferenciación sexual (productos gonadales y no gonadales derivados de los genes de los cromosomas sexuales), los diferentes programas de respuesta a estas señales en distintas regiones cerebrales, y efectos ambientales y culturales que modulan el epigenoma de las células (McCarthy & Arnold, 2011)

1.3.1 Diferencias sexuales en trastornos neurológicos y neurodegenerativos

Las implicaciones de la influencia del sexo en la comprensión y el tratamiento de las enfermedades son considerables. Muchos trastornos relacionados con el SNC muestran diferencias de sexo en su incidencia y/o naturaleza, por lo tanto, el estudio de las diferencias sexuales del cerebro humano sano y en modelos animales de enfermedades neurodegenerativas es importante ya que nos puede ayudar a comprender mejor las diferencias en susceptibilidad, progresión, gravedad de los síntomas y patología de los trastornos neurológicos (Cahill, 2006; Cosgrove et al., 2007).

Por ejemplo, la enfermedad de Parkinson es más común en los hombres que en las mujeres (Wooten et al., 2004), y también lo es el trastorno del espectro autista (Baio et al., 2018; Werling & Geschwind, 2013). Las mujeres, en cambio, tienen más probabilidades que los hombres de desarrollar depresión y ansiedad (Gater et al., 1998; Weissman et al., 1996), y cada vez más estudios muestran que la EA afecta desproporcionadamente a las mujeres (L. L. Barnes et al., 2005; Beam et al., 2018; S. Gao et al., 1998; Gaugler et al., 2023). Aproximadamente dos tercios de los pacientes con EAe son mujeres, aunque los mecanismos biológicos que subyacen a la mayor incidencia siguen siendo en gran medida desconocidos. No solo es importante resaltar la diferencia en la incidencia de la enfermedad según el sexo, sino que las investigaciones muestran que existen diferencias en la patología. Por ejemplo, la patología Tau difiere entre hombres y mujeres en ciertas regiones del cerebro, con un porcentaje de hombres significativamente mayor que el de las mujeres afectados en su hipotálamo, y al contrario sucede en el núcleo basal de Meynert, mostrándose más afectadas las mujeres (Swaab et al., 2001). Por otro lado, la presencia de un único alelo *apoE*ε4* se ha relacionado con una atrofia del hipocampo y una alteración de la memoria significativamente mayor en las mujeres que en los hombres (Fleisher et al., 2005).

1.3.2 Rol de las hormonas ováricas en el cerebro

La mayor prevalencia de EA en mujeres aun no es del todo comprendida, aunque algunas investigaciones sugieren que la baja de hormonas ováricas debido a la menopausia podría tener un rol importante en la patogénesis. Efectivamente, los esteroides ováricos presentan funciones neuroprotectoras y neuromoduladoras (Azcoitia et al., 2019; Singh & Su, 2013; Wharton et al., 2009) y

tienen receptores distribuidos en el cerebro comprendiendo el hipocampo (Brinton et al., 2008; Wharton et al., 2009), una zona notoriamente afectada en la EA (Jack et al., 2011). Durante la menopausia, estos niveles hormonales disminuyen y, por tanto, cae su influencia en el cerebro, lo que podría derivar en una mayor vulnerabilidad a desarrollar EA, aunque actualmente la relación entre demencia y disminución de esteroides ováricos sigue siendo controversial (Brinton et al., 2015; Jett et al., 2022; Pike, 2017). Por ejemplo, el riesgo de demencia aumenta significativamente con la menopausia inducida quirúrgicamente, pero solo si esta inducción se realiza antes de la menopausia natural (Bove et al., 2014; Phung et al., 2010; Rocca et al., 2007).

La comprensión de la importancia de los receptores de estrógenos en regiones cerebrales distintas del hipotálamo (importante para la regulación del comportamiento reproductivo y la función neuroendócrina), fue estimulada por el descubrimiento de la formación de espinas dendríticas inducidas por estrógenos en el hipocampo, lo cual fue demostrado por estudios en los distintos estadios del ciclo estral de los roedores (Gould et al., 1990; Woolley et al., 1990). Estudios posteriores revelaron que los estrógenos se encuentran involucrados no solo en el número y la morfología dendrítica sino también en la regulación de la neurotransmisión excitatoria (Kramár et al., 2009; F. Liu et al., 2008) e inhibitoria (Mukherjee et al., 2017). La regulación de las sinapsis tiene implicancias en la memoria y el aprendizaje (Z. Hu et al., 2016a; F. Liu et al., 2008; Luine et al., 2003).

Los estrógenos también son capaces de modular las respuestas inflamatorias mediadas por células gliales. Por ejemplo, se ha demostrado que disminuyen la reactividad de la microglía y los astrocitos en la proximidad de lesiones cerebrales en ratas (Barreto et al., 2007, 2009; López Rodríguez et al., 2011; K. M. Webster et al., 2015). Además, limitan el daño oxidativo (Razmara et al., 2007) e inducen cambios mitocondriales mejorando su eficiencia funcional (Nilsen et al., 2007). De hecho, la desregulación de estrógenos durante la perimenopausia afecta a la bioenergética cerebral, disminuyendo el metabolismo de la glucosa, la función mitocondrial y la generación de ATP (Rettberg et al., 2014). Estos eventos resultan en una transmisión sináptica alterada (Brinton et al., 2015; Mosconi et al., 2017) y podrían aumentar la susceptibilidad a la EAe en mujeres posmenopáusicas (Jett et al., 2022).

A pesar de las pruebas que demuestran los efectos beneficiosos de los estrógenos y progesterona en el cerebro, la terapia hormonal en mujeres ha dado lugar a resultados confusos y controvertidos, lo cual puede deberse a las múltiples funciones que tienen estos esteroides, y también a cuestiones de diseño experimental, como la formulación de las terapias administradas, la vía de administración, los años transcurridos desde la menopausia hasta iniciar la terapia y el estado de salud del cerebro (Hogervorst, 2013; Maki & Henderson, 2012; Morrison et al., 2006).

1.3.3 Estudio de diferencias sexuales en investigaciones preclínicas

Los modelos animales son fundamentales para dilucidar los procesos relacionados con la demencia. Los roedores macho han sido el organismo modelo por defecto en la investigación neurocientífica (Shansky & Murphy, 2021), constituyendo un problema global a lo largo de los estudios en neurociencias. Incluso para el modelo de STZ-icv, solo unos pocos trabajos recientes han estudiado el efecto de la STZ en el cerebro de la hembra (Biasibetti et al., 2017; Misra et al., 2011). Durante muchos años, la exclusión de las hembras se debió al concepto de que las influencias del sexo son pequeñas y poco fiables (concepto hoy en día cada vez más descartado por muchos neurocientíficos), y a la dificultad de encontrar un diseño

experimental adecuado (dificultad aún existente), generada por preguntas como: ¿Comparamos roedores machos y hembras intactas con fluctuaciones del ciclo estral? ¿Deberían ambos sexos gonadectomizarse y realizar reemplazo hormonal? ¿Hasta qué punto será costoso incluir ambos sexos con grupos múltiples?

Aunque durante los últimos años la comunidad científica ha empezado a avanzar hacia una investigación orientada a las diferencias sexuales, aún queda mucho por hacer. Los estudios preclínicos que incluyan animales de sexo femenino son el primer paso para una comprensión profunda de los mecanismos patogénicos de las enfermedades, y a su vez un paso necesario para el desarrollo de estrategias terapéuticas nuevas o más adecuadas.

1.4 Potencial terapéutico de factores neuroprotectores y antiinflamatorios

1.4.1 IGF1 como molécula neuroprotectora

1.4.1.1 *Bioquímica del IGF1*

El IGF1 pertenece a una pequeña familia de polipéptidos secretados, de cadena simple, que desempeñan importantes funciones en el crecimiento, el desarrollo y el metabolismo. Esta familia incluye la insulina, el IGF1 y el IGF2, en conjunto llamados péptidos insulino similares (ILP), que muestran una gran homología en la secuencia de aminoácidos y comparten una estructura terciaria similar (Fernandez & Torres-Alemán, 2012). En esta introducción se hará foco en el IGF1 con algunas menciones a la insulina.

Los ILP tienen la capacidad de unirse a los receptores de los otros péptidos de la familia, y su activación recluta las mismas cascadas intracelulares específicas, que consisten en cascadas de quinasas-fosfatasa generando respuestas rápidas en la célula, y por otro lado actuando sobre factores de transcripción que generan cambios en la expresión génica. En general, la insulina y los IGFs tienen una acción periférica en la cual regulan el metabolismo energético y el remodelado de tejidos. No obstante, en los últimos años se han descubierto otras funciones de estos péptidos en el cerebro, como se describió en la **sección 1.1.5.4** para la insulina y como se detalla en la próxima sección para el IGF1.

Mientras que la insulina se sintetiza en el páncreas, el IGF1 se sintetiza en gran abundancia en el hígado en respuesta a la hormona de crecimiento. Históricamente, la importancia clínica del IGF1 se ha relacionado con su deficiencia, cuya forma clásica es conocida como Síndrome de Laron, un tipo de enanismo (Laron, 2004). Por otra parte, debido a su actividad mitogénica, la sobresecreción de IGF1 tiene un rol patogénico en ciertos tipos de cáncer (Moschos & Mantzoros, 2002).

El receptor de IGF1 (IGF1R) y el IR pueden formar híbridos funcionales que tienen afinidades similares por IGF1 e insulina, lo que es indicativo de cooperación entre estos dos polipéptidos (Pandini et al., 2002). Estos receptores son heterotetrámeros compuestos de 2 subunidades α extracelulares y 2 subunidades β transmembrana. Ambas subunidades α poseen sitios al ligando y están conectadas por puentes disulfuro, mientras que las cadenas β poseen un dominio extracelular pequeño, un dominio transmembrana y un dominio intracelular, este último con actividad de tirosina quinasa, responsable de la transducción de señales corriente abajo. Tal como sucede con el IR, el IGF1R también sufre autofosforilación inducida por ligando (**Fig. 8**) (Kato et al., 1994). Tras la activación del receptor se asocian proteínas adaptadoras del sustrato del receptor de insulina (IRS). Estas proteínas IRS son fosforiladas también en sus residuos tirosina y reclutan proteínas señalizadoras con dominio SH2 adicionales para transducir las acciones de la insulina o el IGF1. De esta forma, se activan dos cascadas diferentes, la inducida por la unión de la fosfatidilinositol

3 quinasa (PI3K), y la vía de las MAPK inducida por la proteína 2 ligada al receptor del factor de crecimiento (GRB2) (Bondy & Cheng, 2004; Fernandez & Torres-Alemán, 2012).

Como se observa en la **figura 8**, en la vía de la PI3K, esta enzima activada fosforila a un lípido de membrana, el fosfatidil inositol bifosfato (PIP2) a trifosfato (PIP3), reclutando y activando a Akt. La forma activa y fosforilada de esta quinasa (en Ser473y Thr308), actúa en la célula fosforilando otras proteínas diana, como la quinasa diana de rapamicina en células de mamífero (mTOR), a la familia de factores de transcripción Forkhead (FOXO), GSK3, y muchas otras más.

La activación de la quinasa mTOR es muy importante para toda la vía ya que esta proteína fosforila a Akt potenciando su actividad. La acción de mTOR está estrechamente relacionada con la regulación de la autofagia. La señalización PI3K/Akt/mTOR atenúa la autofagia resultando en efectos positivos que mostraron ser protectores para neuronas (Wei et al., 2021) y células derivadas del corazón (H. Liu et al., 2019). En cuanto a la familia FOXO, estos tienen un papel funcional en procesos como la regulación del ciclo celular, muerte celular, metabolismo, protección contra el estrés por oxidación y supervivencia. La fosforilación de FOXO por Akt produce el secuestro citoplasmático de este factor y, por tanto, represión de su actividad transcripcional a nivel del núcleo celular, promoviendo la supervivencia celular de linajes neuronales (Brunet et al., 1999; Santo et al., 2013). Por otra parte, cabe destacar que la fosforilación en Ser9 de GSK3 β por Akt, resulta en la inhibición de esta enzima, y por lo tanto en la disminución de la fosforilación de Tau (Sperber et al., 1995; H. Zhu et al., 2018).

La activación de esta vía también frena la apoptosis celular. Esto se observó en cultivo primario de neuronas hipocámpales de ratón (*wild type* y p53 deficientes), en las cuales la activación de Akt mediada por tratamiento con IGF1, inhibió la actividad transcripcional de p53, una proteína supresora de tumores que media la muerte celular. De esta forma, el tratamiento con IGF1 confirió protección frente a la muerte celular inducida por hipoxia u óxido nítrico, redujo en la fragmentación del ADN, e inhibió la activación de la caspasa-3 en neuronas *wild type*, mientras que no se observaron cambios en los parámetros de apoptosis en las neuronas p53 deficientes (Yamaguchi et al., 2001). Globalmente, la vía de la PI3K contribuye a la supervivencia y crecimiento celular.

Por otro lado, en la vía de las MAPK participa una proteína G monomérica llamadas Ras, que al activarse por intercambio de GDP por GTP, promueve una cascada de fosforilaciones de las enzimas de la familia MAPK, las quinasas Raf-1, MEK y ERK. La vía de las MAPK genera cambios transcripcionales en la célula, ya que ERK es capaz de ingresar a la célula y fosforilar diversos factores de transcripción, entre ellos CREB, Elk1 y c-Myc. La regulación de la proliferación celular es la función mejor estudiada de ERK1 y ERK2, ya que estas enzimas se activan en respuesta a factores de crecimiento y promotores tumorales asociados con la proliferación celular (Mebratu & Tesfaigzi, 2009).

1.4.1.2 Efectos neurotróficos y neuroprotectores del IGF1

Como se mencionó previamente, los ILP pueden atravesar la BHE y los plexos coroideos, probablemente por unión a su receptor y posterior transcitosis, (Banks, 2004; Carro et al., 2005; Pan & Kastin, 2000), pero también se sintetizan localmente en el cerebro. Según se observó en roedores y humanos, durante el desarrollo embrionario y la etapa perinatal, el IGF1 se expresa fuertemente en diversas áreas y linajes del cerebro (Aguado et al., 1994; Ayer-Le Lievre et al., 1991; M. A. Bach et al., 1991; Han et al., 1988; Sandberg et al., 1988), aunque su síntesis se reduce drásticamente en el cerebro adulto (M. A. Bach et al., 1991; Sandberg et al., 1988). De forma similar, la producción del IGF1 sérico es alta

durante la niñez, llegando a su pico durante la pubertad, un periodo que coincide con la rápida proliferación celular y el crecimiento lineal (Yamamoto et al., 1991). Hacia la tercera década, la producción de IGF1 disminuye bruscamente y luego sigue disminuyendo de forma constante con el envejecimiento.

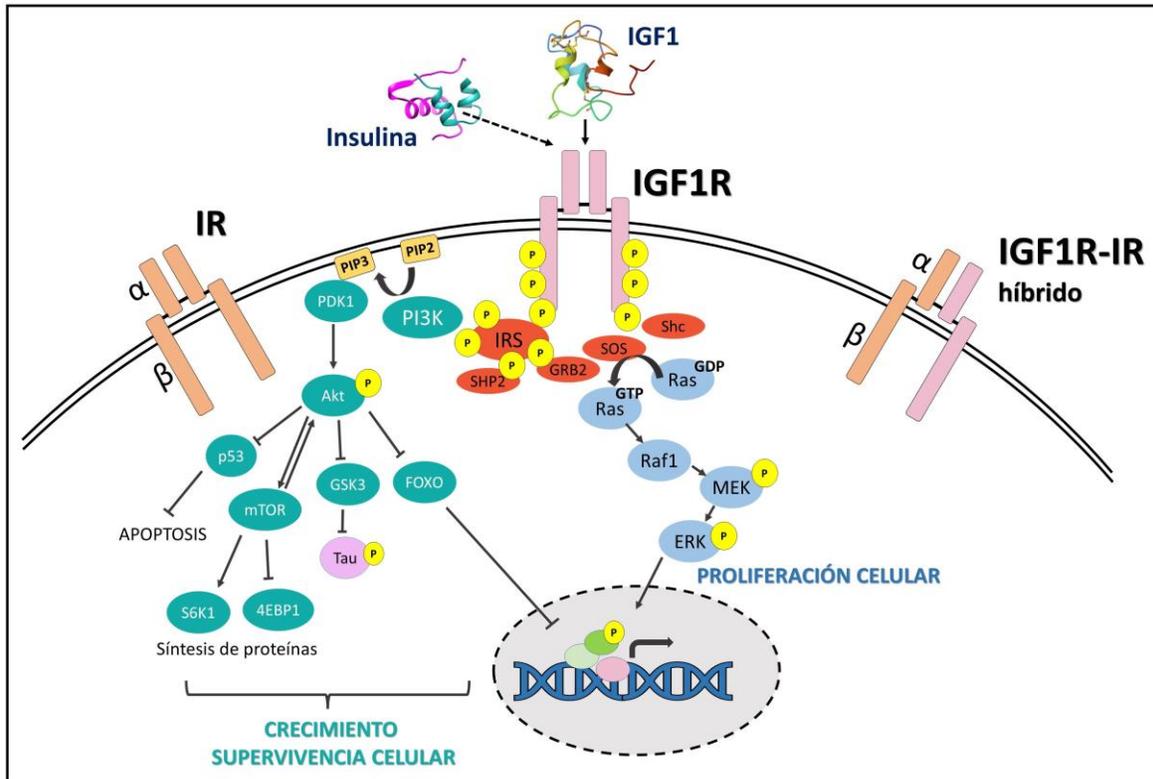


Figura 8: Vía de señalización del IGF1 y la insulina. Tras la activación del receptor tipo tirosin quinasa, se produce su autofosforilación y reclutamiento de proteínas adaptadoras como IRS, GRB2 y SOS, lo cual conduce a la activación de dos vías en la célula, la vía de PI3K (turquesa) y la vía de las MAPK (celeste). La primera conduce a respuestas que promueven principalmente el crecimiento y la supervivencia celular, y la segunda a la proliferación celular. Imagen adaptada de (Griffeth et al., 2014).

El IGF1 tiene roles importantes para el desarrollo del SNC, ya que modula el crecimiento y la proliferación celular, impactando en el tamaño del cerebro. Es así como la falta de los ILP por mutaciones da lugar a cerebros pequeños (Baker et al., 1993; Netchine et al., 2011). Además, el IGF1 es un potente promotor de la proliferación de células precursoras neurales y promueve los pasos posteriores de la diferenciación de neuronas y oligodendrocitos (Barres et al., 1992; Cui et al., 2005; Huat et al., 2014; Torres-Aleman et al., 1994). El IGF1 es una señal prototípica de supervivencia para las neuronas en desarrollo y contribuye a todos los pasos posteriores de la maduración neuronal, incluida la formación de neuritas, la axogénesis y la guía de axones, el establecimiento de sinapsis y la formación de circuitos (Okano et al., 2011; Özdinler & Macklis, 2006).

Con respecto a los efectos mediados por el IGF1 en el cerebro adulto, si bien sus niveles de expresión disminuyen durante la adultez, se ha observado que en situaciones patológicas y de injuria, hay una sobreexpresión del IGF1 y de sus proteínas transportadoras, lo cual sugiere un rol importante de este polipéptido en la reparación del daño celular. Por ejemplo, su expresión se induce intensamente en el SNC

después de daño axonal (Guthrie et al., 1995), isquemia cerebral (W. H. Lee et al., 1996), injuria cortical (Walter et al., 1997), y lesiones en la médula espinal (Yao et al., 1995).

La infusión directa de IGF1 se ha usado para recuperar y rescatar la función motora en distintos modelos animales. Por ejemplo, en un modelo de ataxia cerebelar en rata inducida por 3-acetilpiridina, la administración subcutánea o icv de IGF1 restauró la coordinación motora y rescató parcialmente a las neuronas de la oliva inferior del efecto tóxico de esta sustancia (Fernandez et al., 1998). En otro estudio, células progenitoras neurales humanas que sobreexpresaban IGF1 fueron trasplantadas en ratas, 7 días antes de someterlas a inyección nigral de 6-hydroxydopamina, para generar un modelo de enfermedad de Parkinson; el tratamiento redujo la asimetría rotacional y la pérdida de neuronas dopaminérgicas, efectos que no fueron evidenciados con el implante de células que no sobreexpresaban IGF1 (Ebert et al., 2008). Por otra parte, otro trabajo demostró que la inyección subcutánea de IGF1 aumentó la supervivencia, la fuerza muscular y la coordinación motora en ratones mutantes para *pnm*, un modelo con degeneración de las neuronas motoras (Jablonka et al., 2011).

Por otro lado, relacionado a la EA, se ha informado que la incubación de IGF1 es capaz de rescatar neuronas hipocampales de cultivo primario de rata, preexpuestas al péptido β A durante 4-5 días (Doré et al., 1997), y que reduce su carga en ratones transgénicos que sobreexpresan una forma mutante de la APP (modelo Tg2576) (Carro et al., 2002). Este efecto se observó luego de tratar durante un mes a los animales con IGF1 y constatar que este polipéptido favorece la eliminación del péptido β A mediante la mejora de proteínas que lo transportan, como la albúmina. Posteriormente, el mismo grupo de investigación demostró que si se bloquean los IGF1R en los plexos coroideos de ratas Wistar, se produce acumulación del péptido β A en la corteza de los animales, y deterioro del aprendizaje (Carro et al., 2006).

El IGF1 también regula la neurogénesis adulta. En este sentido, se demostró que la infusión periférica de IGF1 en ratas, aumenta las células BrdU-positivas aproximadamente un 80% y 50% en la capa celular granular y zona subgranular (SGZ) del hipocampo, tras 6 y 20 días de administración, respectivamente (Åberg et al., 2000). El aumento de IGF1 circulante inducido por el ejercicio provoca efectos similares sobre la neurogénesis hipocampal (Trejo et al., 2001), y cada vez hay más pruebas de que la formación de nuevas neuronas en el hipocampo adulto está implicada en el aprendizaje y la memoria (Deng et al., 2010).

1.4.2 Factor tímico sérico o timulina

1.4.2.1 Bioquímica de la timulina

El timo es una pequeña glándula inmune y endócrina, principal lugar de ontogenia y selección de células T durante el desarrollo fetal, y produce numerosas hormonas y factores que promueven la maduración de las células T o modulan sus funciones (Hadden, 1992). Uno de estos factores es la timulina, un nonapéptido (pyroGlu-Ala-Lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ser-Asn-OH) (Pleau et al., 1977) de 847 daltons de peso molecular que fue en primer lugar denominado factor tímico sérico (FTS), por ser encontrada en el suero normal y en extractos tímicos (J. F. Bach et al., 1977; Dardenne & Bach, 1973). La ausencia del FTS en el suero de ratones timentomizados y de ratones congénitamente atímicos (*nude*) y su presencia tras el trasplante de timo, demostró su exclusivo origen tímico (Dardenne & Bach, 1973). En efecto, mediante diferentes técnicas de inmunofluorescencia, inmunocitoquímica e inmunoelectromicroscopía, utilizando anticuerpos anti-FTS pudo confirmarse la localización de este factor en el citoplasma de las células epiteliales tímicas (CET) (Auger et al., 1984; Schmitt et al., 1980). Posteriormente se confirmó que la

timulina se coordina al ion Zn^{+2} en una relación equimolecular (Gastinel et al., 1984), el cual le confiere su actividad biológica característica, que es evaluada por un bioensayo desarrollado por Dardenne y Bach, que utiliza la formación de rosetas a partir de glóbulos rojos de oveja (Dardenne y Bach 1975).

En el humano, los niveles más elevados de timulina sérica se han detectado desde el período neonatal hasta la adolescencia, momento en el que comienzan a declinar alcanzando valores muy bajos a mediados de la tercera década; a partir de este momento, permanecen constantes durante el envejecimiento (se dosó hasta los 80 años) (Consolini et al., 2000). Esto se corresponde con la involución que sufre el timo desde muy temprana edad (Lynch et al., 2009).

1.4.2.2 Potencial terapéutico de la timulina

La timulina ejerce distintas acciones sobre el sistema inmune. Se ha demostrado que tiene efectos antiinflamatorios y antifibróticos en varios modelos de enfermedad, modulando la proliferación y diferenciación de células (Tabla 1 de Savino & Dardenne, 2000). Diversos estudios muestran que la timulina es capaz de modular procesos inflamatorios a nivel periférico y central.

Por ejemplo, el tratamiento con timulina promovió una inhibición de la síntesis local de varias citoquinas y quimiocinas proinflamatorias en modelos de enfermedades caracterizados por presentar una respuesta inflamatoria. La administración intraperitoneal de timulina redujo la respuesta inflamatoria celular y los cambios fibróticos en un modelo experimental de fibrosis pulmonar (Yara et al., 2001). Por otra parte, en un modelo de leishmaniasis cutánea en ratón que produce hiperalgesia y aumento de los niveles de interleuquina $IL1\beta$ y factor de crecimiento nervioso, la inyección de timulina mejoró el umbral nociceptivo y disminuyó los niveles de estos factores (Kanaan et al., 2002). En dos modelos de hiperalgesia e inflamación generados con inyección de LPS intraplantar o intraperitoneal (IP) en rata, el pretratamiento con timulina fue capaz de reducir la hiperalgesia, bajar la fiebre y los niveles de $IL1\beta$, $TNF\alpha$ e $IL-6$ (Safieh-Garabedian et al., 2002). Recientemente, la terapia con timulina unida a nanopartículas con el fin de aumentar su vida media, suprimió la respuesta proinflamatoria en un modelo de inflamación crónica en ratones tratados con LPS (Novoselova et al., 2018).

Además, la timulina ha demostrado ejercer una acción antiinflamatoria sobre el SNC y, de esta manera, se le otorga un rol potencialmente neuroprotector. Precisamente, en un modelo de inflamación cerebral por inyección icv de LPS, el pretratamiento icv con timulina o con un péptido sintético análogo a la timulina, redujo la hiperalgesia y normalizó y redujo los niveles elevados de expresión de distintos mediadores proinflamatorios en diferentes áreas del cerebro (Safieh-Garabedian et al., 2003, 2011).

Aún no se conoce el mecanismo preciso mediante el cual la timulina ejerce su protección en los tejidos dañados y en las alteraciones mencionadas. Se ha demostrado que la timulina potencia la función del subtipo humano del receptor nicotínico de acetilcolina $\alpha 7$ (nAChR- $\alpha 7$), expresado en oocitos de *Xenopus* (Safieh-Garabedian et al., 2013), lo que sugiere que podría estar mediando sus acciones antiinflamatorias, al menos en parte, a través de este receptor. Se ha demostrado que el nAChR- $\alpha 7$ desempeña un papel importante en el control de la inflamación, a través de la “vía colinérgica antiinflamatoria”, un mecanismo compuesto por el nervio vago y su principal neurotransmisor, la acetilcolina (Rosas-Ballina & Tracey, 2009; H. Wang et al., 2002).

1.5 Transferencia de genes terapéuticos

1.5.1 Generalidades

La transferencia de genes se refiere al uso de ácidos nucleicos para cambiar la expresión génica, incrementando, disminuyendo o suprimiendo la expresión de una proteína de interés. La aplicación más ambiciosa de la transferencia de genes es la terapia clínica, en la cual el tratamiento de enfermedades, hereditarias o adquiridas, se realiza mediante la transferencia *ex vivo* o *in vivo* de ácidos nucleicos que alteran la expresión de proteínas específicas, esperando resultar en un beneficio terapéutico (Dube & Cournoyer, 1995). Se puede transferir una diversidad de ácidos nucleicos, los que incluyen genes, oligonucleótidos, ribozimas, ADNzimas, aptámeros y ARN de interferencia (Patil et al., 2005).

El primer ensayo de terapia génica en humanos se realizó en 1990, para tratar en niños una de las formas de inmunodeficiencia combinada severa (SCID) ocasionada por un defecto genético en el gen que codifica a la adenina deaminasa (ADA), la cual es imprescindible para la diferenciación de las células madre en células maduras del sistema inmune, tal como los linfocitos T y B. La manipulación se realizó *ex vivo*: se extrajeron células de la médula ósea del paciente, se las infectó *in vitro* con retrovirus portadores del gen normal de la ADA y luego se lo transfirió al paciente. Cuatro años después los niños tratados llevaban a cabo una vida normal (Blaese et al., 1995). En 2016, la terapia génica para esta enfermedad fue aprobada por la Comisión Europea quien concedió los permisos para la comercialización de Strimvelis™, que consiste en una única infusión de células madre hematopoyéticas (autólogas) corregidas genéticamente (Aiuti et al., 2017). Esta fue la primera terapia génica *ex vivo* aprobada en Europa. Desde la década de los 90 se han llevado a cabo cientos de ensayos clínicos de terapia génica, teniendo como resultado, en China en 2003, la primera aprobación de un producto llamado Gendicina, para el tratamiento del carcinoma de células escamosas de la cabeza y el cuello (W. W. Zhang et al., 2018). En 2017 la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos aprobó por primera vez dos productos de terapia génica, Kymriah y Yescarta, para ciertas forma de linfoma (Seimetz et al., 2019). Una lista de los productos de terapia génica aprobados es detallada en Arabi et al., 2022. Actualmente se encuentran activos (sin reclutar) 132 ensayos clínicos con terapia génica (<https://clinicaltrials.gov/>).

Recientemente una nueva faceta de la terapia génica emergió, que consiste en la edición genómica con nucleasas programables guiadas hacia el gen de interés, que producen roturas de doble cadena del ADN. Este daño en el ADN puede repararse mediante reparación dirigida por homología, o mediante la unión errónea de extremos no homólogos, dando lugar a modificaciones genéticas específicas, incluyendo la interrupción, inserción, corrección y reordenación cromosómica de genes. Para que la edición del genoma sea eficaz, es necesario primero realizar la transferencia de la maquinaria de edición en las células diana. Las nucleasas programables se introducen en células cultivadas, embriones u organismos enteros en diversas formas, como ADN plasmídico, ARNm transcrito *in vitro*, vectores virales o proteínas purificadas (H. Kim & Kim, 2014).

1.5.2 Métodos de transferencia génica

En general, la captación celular de moléculas de ADN desnudo y polinucleótidos en general, independientemente de sus tamaños, sigue siendo un proceso ineficiente. Además, estas moléculas son inestables *in vivo*, por ser rápidamente degradadas por exo- y endonucleasas hidrolíticas (Patil et al., 2005). Consecuentemente, se han desarrollado numerosas estrategias de transferencia de

polinucleótidos, tanto *in vitro* como *in vivo*, para facilitar la inserción de estas moléculas en las células blanco y para protegerlas de la degradación celular. El tipo de molécula terapéutica y el propósito clínico que se persigue determinan la elección de la estrategia a utilizar.

Un método óptimo de transferencia génica para fines terapéuticos debe lograr proteger al transgén de la degradación por las nucleasas en la matriz intercelular, transportarlo a través de la membrana plasmática e introducirlo al núcleo de las células blanco. Adicionalmente, debe tener un alto grado de especificidad, una elevada eficiencia de transferencia, una expresión duradera y no debe generar efectos colaterales (X. Gao et al., 2007).

Los métodos de transferencia de ácidos nucleicos pueden ser clasificados en físicos y en vectoriales, que a su vez pueden ser vectores virales o no virales. Los métodos físicos, como la inyección con aguja, la electroporación, bombardeo de partículas, ultrasonido y la administración hidrodinámica, emplean una fuerza física que penetra en la membrana celular y facilita la transferencia intracelular de genes. Sin embargo, estos métodos siguen siendo mucho menos eficaces que los vectores virales, especialmente para la administración de genes *in vivo*, y son extremadamente difíciles de estandarizar en un entorno clínico; además se consideran laboriosos, poco prácticos e invasivos (X. Gao et al., 2007; Patil et al., 2005).

La mayoría de los vectores no-virales incluyen el uso de polímeros y lípidos para transferir el material génico al interior celular. Durante este proceso, protegen al ADN de la degradación enzimática extracelular e intracelular y de los componentes de la sangre, aunque pierden una cantidad significativa de ADN que finalmente resulta en la disminución de la expresión terapéutica del transgén (Basarkar & Singh, 2007). Estos vectores, conteniendo el ADN, son captados por las células y una vez en las vesículas intracelulares, una pequeña porción de ADN es liberada al citoplasma, migra hacia el núcleo y entra en él (Basarkar & Singh, 2007; X. Gao et al., 2007). Los vectores no-virales poseen una escasa o nula inmunogenicidad; son fáciles de preparar y manipular, especialmente a nivel industrial; pueden transportar mayor cantidad de material génico y, aunque no están exentos de riesgo, son más seguros que los vectores virales. Sin embargo, este tipo de vectores posee una significativa desventaja: su efectividad es muy inferior a la de los vectores virales, especialmente *in vivo* (Basarkar & Singh, 2007; X. Gao et al., 2007).

Los virus están altamente especializados en la transferencia de ácidos nucleicos, por lo tanto, la realizan con alta eficiencia. Los vectores virales son esencialmente virus a los que se ha despojado de los genes necesarios para la replicación, conservando al mismo tiempo su capacidad para transducir células. El gen de interés se incorpora entonces al genoma viral. Sin embargo, también poseen desventajas, tales como la respuesta inmune que desencadenan, la limitación en el tamaño del transgén que pueden transportar, lo dificultoso de su producción a escala industrial y la potencial mutagénesis insercional que pueden producir (Basarkar & Singh, 2007; X. Gao et al., 2007; Patil et al., 2005).

Los vectores virales más utilizados son los basados en adenovirus, virus adenoasociados y retrovirus, con un uso en terapia génica aproximadamente del 50, 28 y 22% respectivamente (Bulcha et al., 2021). El futuro de los vectores virales es prometedor y tiene potencial para hacer frente a muchas enfermedades genéticas humanas. Sin embargo, debido a eventos adversos ocurridos en ensayos clínicos, existe un interés creciente en el perfeccionamiento y aumento de la efectividad de vectores no-virales.

1.5.2.1 Vectores adenovirales

Los adenovirus (Ad) pertenecen a la familia Adenoviridae, siendo los que infectan a mamíferos del género *Mastadenovirus*. Las partículas adenovirales consisten en una cápside icosaédrica sin envoltura, la cual encapsula el ADN genómico de doble cadena de 30 a 38 kbp de tamaño (**Fig. 9A**). Los Ad pueden infectar células de diversos tejidos, sobre todo infecciones de las vías respiratorias superiores, pero también puede infectar otros órganos como el cerebro y la vejiga. El genoma Ad está flanqueado por repeticiones terminales invertidas (ITR) en forma de horquilla que varían en longitud (aproximadamente 100 pb). Las ITR son estructuras esenciales para la replicación del ADN viral. Una señal de empaquetamiento situada en el brazo izquierdo del genoma es necesaria para el empaquetamiento del genoma vírico (**Fig. 9B**) (Schaffer et al., 2008).

La infección viral se inicia con el reconocimiento e interacción específica entre proteínas de la cápside viral y receptores celulares de superficie de alta afinidad para adenovirus y virus coxsackie B, denominados CAR (Tomko et al., 1997). Subsecuentemente, el virus es endocitado y entra a la vía endosomal. Luego, la acidificación endosomal produce un cambio conformacional en la cápside con liberación de proteínas estructurales, que desencadena la endosmosis y la liberación del virión al citoplasma. En el citoplasma, el virión con su cápside parcialmente desensamblada viaja utilizando el citoesqueleto hasta la membrana nuclear. Posteriormente, el ADN vírico entra en el núcleo a través del complejo de poros de la envoltura nuclear (Wiethoff & Nemerow, 2015).

En el núcleo el genoma viral permanece en un estado no integrado o episómico y comienzan los procesos de transcripción de los genes virales y de replicación del genoma viral. La transcripción de los genes de los adenovirus ocurre en dos etapas consecutivas: una fase temprana, durante la cual se expresan los genes tempranos, denominados E (del inglés, *early*), y una fase tardía, durante la cual se expresan los genes tardíos, denominados L (del inglés, *late*). Los genes E, que comprenden los E1A, E1B, E2A, E2B, E3 y E4, son aquellos que se expresan antes de la replicación del ADN y en su mayoría codifican para proteínas involucradas en la transcripción de los genes virales, la replicación de ADN viral, la supresión de la respuesta inmune y la inhibición de la apoptosis de la célula huésped. Los genes L, que comprenden los L1 a L5, se expresan después de la replicación del ADN y codifican para las proteínas necesarias para el ensamblaje del virus, la liberación y la lisis de la célula huésped (**Fig. 9B**) (Gingeras et al., 1982).

Los vectores Ad recombinantes (RAAd) contemporáneos derivan de los serotipos humanos HAd2 y HAd5. Se han desarrollado diversas estrategias para la generación de vectores RAAd, las cuales se basan en efectuar modificaciones en el genoma viral en el que subsecuentemente se clona el transgén de interés. Existen tres tipos de vectores Ad:

- **Vectores RAAd de primera generación:** Fueron los primeros vectores Ad en generarse. Se basan en adenovirus a los que se les suprimieron los genes tempranos E1 o E1 y E3 del genoma viral. La eliminación de la región E1 lleva a la incapacidad del virus para replicar y generar progenie (McGrory et al., 1988) y la supresión de la región E3 genera más espacio dentro del genoma para clonar secuencias exógenas. En consecuencia, estos RAAd son replicación defectivos evitando así la infección viral generalizada. Para amplificarlos en el laboratorio, se usan líneas celulares específicas, como la línea celular transgénica derivada de riñón de embrión humano 293 (HEK 293), que contiene la región genómica E1 faltante del Ad5 y, por lo tanto, expresa los genes necesarios para iniciar la replicación (Graham et al., 1977). Sin

embargo, se ha observado que, a pesar de la eliminación de E1, se expresan residualmente proteínas virales que desencadenan una respuesta inmune intensa, la cual elimina las células infectadas (Y. Yang et al., 1994)

- **Vectores RAd de segunda generación:** generados con el objetivo de reducir la inmunogenicidad. En estos vectores se elimina de forma completa o parcial las regiones E2 y E4 (Osada et al., 2009). Ambos genes son esenciales para la replicación viral y, por lo tanto, el vector necesita producirse en líneas celulares que le provean todas las regiones suprimidas. Este tipo de líneas celulares son difíciles de trabajar y la producción del vector es, frecuentemente, poco eficiente (Lusky et al., 1998)

- **Vectores RAd de tercera generación o helper-dependent:** Se eliminan todos los genes adenovirales del vector, salvo las secuencias necesarias *en cis* (los ITRs y la señal de empaquetamiento), con el objetivo de evitar la inmunotoxicidad del vector (Alba et al., 2005). Para generar y producir este tipo de vectores se necesitan *in trans* todos los elementos necesarios para la replicación y el empaquetamiento. Generalmente esto se logra con la coinfección de las células productoras con un adenovirus denominado virus auxiliar (*helper*). El desafío de este tipo de metodología es eliminar o, al menos, disminuir la presencia de virus auxiliar en la preparación final.

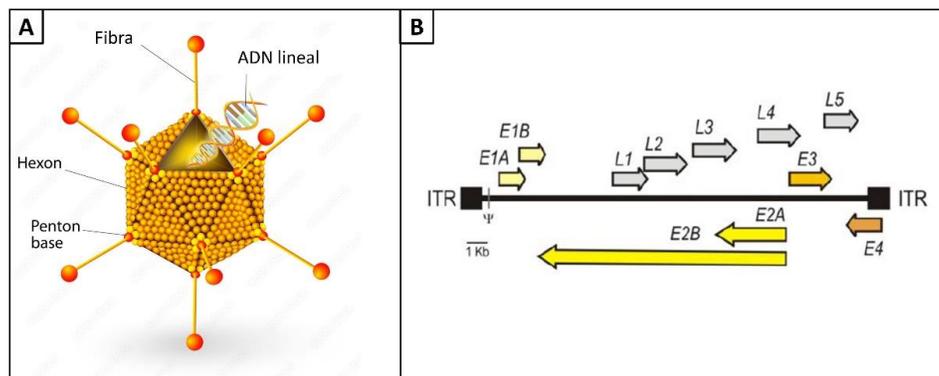


Figura 9: **Representación esquemática de un adenovirus y su organización genética.** Esquema de la estructura de un adenovirus de tipo 5 (A). En la figura se indica los genes E y L, flanqueado por las secuencias ITR (B). ITR, repeticiones invertidas terminales. Ψ, señal de empaquetamiento.

Las ventajas de los vectores RAds se resumen en: 1) alta eficiencia de transducción, tanto en células quiescentes como en división; 2) amplio tropismo por diferentes tejidos diana, 3) capacidad de clonado de hasta 32 kbp de ADN (en helper-dependent); 4) fáciles de manipular en el laboratorio; 5) factibles de producirse en títulos elevados; y 6) persistencia epicromosómica en la célula huésped, descartando el riesgo de mutagénesis insercional (Bulcha et al., 2021). Sin embargo, los vectores Ad poseen una importante limitación, la intensa respuesta inmune que inducen en el hospedador, dirigida contra la partícula viral y las células infectadas. Como consecuencia de dicha respuesta inmune, se limita la duración de la expresión del transgén (la cual generalmente es transitoria) y se restringe la re-administración del vector. Si bien esta limitación se ha superado en el caso de los vectores helper-dependent, estos son difíciles de producir en estado de suficiente pureza (Alba et al., 2005).

En este trabajo se utilizaron vectores RAd de primera generación construidos en nuestro laboratorio. La elección de este tipo de vectores se debe a las ventajas de construcción, amplificación y purificación

que tienen estos vectores respecto a los otros tipos descriptos. Por otro lado, se consideró que uno de los transgenes portados corresponde a la timulina, una molécula inmunosupresora que podría atenuar la respuesta inmune desencadenada por el vector.

1.5.3 Terapia génica con IGF1

En nuestro laboratorio se han realizados diversos experimentos de terapia génica con IGF1 en ratas viejas (más de dos años de edad), utilizando un vector adenoviral portando el gen de IGF1 de rata (RAd-IGF1). Estos experimentos han mostrado resultados promisorios en el comportamiento y en el cerebro de este modelo de envejecimiento. Uno de los primeros experimentos con este vector, demostró su eficacia en revertir de manera prácticamente completa, la hiperprolactinemia que presentan las ratas hembra seniles causada por una neurodegeneración en sus neuronas tuberoinfundibulares dopaminérgicas (Hereñú et al., 2006). Para este experimento, el RAd-IGF1 (o su vector control RAd-DsRed) fue inyectado en el hipotálamo de ratas seniles (28 meses) y ratas hembra jóvenes (5 meses), y sus efectos evaluados 17 días post inyección. Además de modificar los niveles de la prolactina sérica, los resultados morfométricos revelaron un incremento significativo del número de células tirosina hidroxilasa inmunorreactivas en el hipotálamo de los animales tratados, en comparación con los controles. Ninguno de estos efectos fue observado en las ratas jóvenes. Estos resultados sugieren que el IGF1 podría tener una acción neurogénica en la población hipotalámica dopaminérgica en las ratas seniles (Hereñú et al., 2006). De la misma forma, utilizando el mismo vector también en ratas hembra seniles (30 – 31 meses) pero inyectándolo por vía icv, lo cual resultó en una alta expresión del transgén en las células ependimarias, se demostró que la terapia génica con IGF1 generó una mejora significativa de la performance motora que se encuentra deteriorada por la edad en estos animales (Nishida et al., 2011), y que también tuvo un efecto antiinflamatorio al modular la población microglial en la unidad caudado-putamen (Falomir-Lockhart et al., 2022).

Los efectos en la memoria y el aprendizaje de la terapia génica con IGF1 de corto y largo plazo en ratas seniles también fue demostrado por integrantes de nuestro grupo. El primer tratamiento se realizó por inyección icv bilateral del RAd-IGF1 en ratas hembra de 28 meses, en las cuales dos semanas después de esta inyección, se realizó el test del Laberinto de Barnes (LB) para evaluar la memoria espacial. Las ratas viejas tratadas con IGF1 mostraron una mejora en su memoria espacial con respecto de las ratas control, y en su hipocampo se observó un aumento de las neuronas inmaduras marcadas por doble cortina (DCX), y un aumento de la arborización de los astrocitos GFAP+ en el SR (Pardo et al., 2016). En cuanto a los experimentos de terapia génica a largo plazo con IGF1, se realizó la eutanasia de los animales ochenta días post inyección del vector terapéutico, y se observó que la terapia fue capaz de mejorar la memoria espacial y de inducir la expresión de genes relacionados a procesos sinápticos como la neuronatina, la subunidad $\alpha 8$ de Integrina y la proteína sinaptofisina-Símil 2. Además, aumentó la expresión del miRNA 186, una molécula que se ha documentado que participa en el procesamiento de los péptidos βA (Pardo et al., 2018). Por lo tanto, este enfoque de transferencia génica de IGF1 confirió neuroprotección del hipocampo envejecido.

La terapia con IGF1 también ha demostrado ser eficiente en revertir el daño observado en modelos de injuria aguda generados en rata. Por ejemplo, en un modelo de injuria traumática cerebral, la terapia génica con IGF1 aplicada post insulto redujo el estrés oxidativo en el hipocampo y la corteza prefrontal y

motora, lo que a su vez previno los déficits cognitivos, restaurando el rendimiento de la memoria de trabajo de los animales (Montivero et al., 2021). Por otro lado, la transferencia génica de IGF1 restauró la neurogénesis hipocampal y mejoró las alteraciones de memoria generadas por lesión de médula espinal (Jure et al., 2021). Además, esta terapia moduló a la microglía de forma diferencial en las distintas regiones del hipocampo. En el Hilus y la capa molecular del giro dentado (GD), la terapia génica con IGF1 recuperó el número de microglía homeostática coincidiendo con una reducción del número de células de microglía hipertrófica. Sin embargo, en el nicho neurogénico, IGF1 redujo el número de microglías ramificadas y aumentó el número de microglías hipertróficas, que en su conjunto expresaban arginasa-1 (Jure et al., 2021).

En conclusión, la terapia génica con IGF1 ha demostrado ser eficiente en diversos modelos animales, no solo en la estimulación de la proliferación neuronal y la modulación del fenotipo microglial, sino también revirtiendo las alteraciones comportamentales observadas, por lo que resulta una estrategia promisoriosa e interesante a aplicar en el modelo de EAe generado con STZ, que se caracteriza por mostrar una marcada neurodegeneración, reactividad glial y alteraciones cognitivas.

1.5.4 Terapia génica de timulina

Para realizar terapia génica con timulina, en nuestro laboratorio se diseñó un gen sintético para este factor (metionina-FTS o metFTS), y se construyó un vector RAd que expresa dicho gen reteniendo la bioactividad del péptido natural (Reggiani et al., 2006). Utilizando ratas timectomizadas, se demostró que una única inyección intramuscular (im) o cerebral (inyección en la sustancia nigra) de este vector, logra una expresión estable y aumentada de timulina durante al menos 110 días en suero, y 90 días en sustancia nigra, respectivamente (Morel et al., 2006). Con esta herramienta, se lograron prevenir las alteraciones a nivel hipotálamo-gonadotropo-ovárico que típicamente ocurren en los ratones hembra *nude* en la adultez (Goya et al., 2007).

Más recientemente, este gen sintético para timulina fue utilizado en experimentos de terapia génica con nanopartículas, en un modelo murino de asma alérgica provocada por ovoalbúmina. Específicamente, la administración por vía intratraqueal de nanopartículas compactas de ADN con el gen metFTS, plásmido vacío o solución salina, demostró que la timulina es capaz de prevenir eficazmente el proceso inflamatorio y de remodelación en los pulmones asmáticos, lo que potencia la reparación de las vías respiratorias y mejora así la mecánica pulmonar en un destacado modelo de ratón de inflamación alérgica (Da Silva et al., 2014). En un experimento posterior en el cual las nanopartículas se administraron luego del último tratamiento con ovoalbúmina, se observó que la timulina fue capaz de reducir la infiltración pulmonar de eosinófilos que impulsa principalmente el aumento del recuento global de leucocitos en los pulmones del modelo de asma, y que probablemente module el fenotipo de diversas células inmunitarias, como eosinófilos, neutrófilos, linfocitos y macrófagos (da Silva et al., 2020).

1.6 Terapia con células madre mesenquimales

La derivación de células madre a partir de blastocistos humanos (Thomson, 1998) y la obtención de células madre pluripotentes inducidas (iPSC) (Takahashi & Yamanaka, 2006) inauguraron una nueva era en la investigación terapéutica celular. El enorme potencial de diferenciación de las iPSC abrió nuevas posibilidades en el contexto de la medicina regenerativa, para mejorar la respuesta reparadora de los

tejidos disfuncionales y dañados. De esta manera, los objetivos de las terapias con células madre suelen centrarse en la sustitución celular o en el enriquecimiento del entorno.

1.6.1 Células madre: generalidades

Las células madre son una población única de células presentes en todas las etapas de la vida que poseen la capacidad de autorrenovarse y diferenciarse en múltiples linajes celulares. Estas células son mediadores clave en el desarrollo de los neonatos y en los procesos de restauración tras una lesión o enfermedad, ya que son la fuente de la que derivan tipos celulares específicos dentro de los tejidos y órganos diferenciados. Según su potencial de diferenciación, puede ser clasificadas como totipotentes, pluripotentes o multipotentes. Así, las células madre totipotentes (es decir, capaces de originar un organismo completo) corresponden al cigoto y a las células resultantes de sus divisiones celulares iniciales (hasta la etapa de mórula). Las células pluripotentes (capaces de originar células de los tres folículos germinativos) incluyen las células madre embrionarias, las células germinales embrionarias, células de carcinoma embrionario, así como las células de pluripotencialidad inducida (iPSCs). Por otro último, las células multipotentes tienen un espectro de diferenciación más estrecho, pero pueden especializarse en células discretas de linajes celulares específicos. Como ejemplo tenemos a las células madre fetales, de los recién nacidos (como las células madre del cordón umbilical) y del adulto (como las células madre de la médula ósea y las células madre neurales). Estas últimas proliferan lentamente, se encuentran en nichos específicos, y su función primaria es el mantenimiento de la homeostasis tisular, permitiendo la curación, el crecimiento y la sustitución de las células que se pierden cada día (Zakrzewski et al., 2019).

1.6.1.1 Células madre mesenquimales

En la médula ósea existen dos poblaciones de células madre o estromales, las células madre hematopoyéticas (HSC), que dan origen a todo el linaje hematopoyético, y las células madre mesenquimales (MSC) o también llamadas células estromales mesenquimales, que forman las células del tejido conectivo de la médula ósea. En ese nicho biológico, las MSC proporcionan además soporte para el mantenimiento y la autorrenovación de las HSC, protegiéndolas de estímulos apoptóticos (Uccelli et al., 2008).

Las MSC pueden describirse como progenitores de morfología fibroblasto-símil, que se obtienen cuando se cultivan células adherentes al plástico a partir de diversos tejidos. Una característica que comparten las MSC es la capacidad de diferenciarse a osteoblastos, condroblastos y adipoblastos (Pittenger et al., 1999). Además de ser aisladas de médula ósea, las MSC se lograron obtener en cultivos a partir de diferentes tejidos u órganos fetales y adultos, como hígado, pulmón, riñón, músculo esquelético, tejido adiposo, entre otros (da Silva Meirelles et al., 2006). Incluso, se ha establecido este tipo de cultivos a partir de cordón umbilical, ya sea de la totalidad del tejido (Majore et al., 2011), del tejido conectivo mesenquimático o gelatina de Wharton (Karahuseyinoglu et al., 2007), de la sangre contenida en el cordón umbilical (Broxmeyer et al., 2006) o de áreas perivasculares (células perivasculares de cordón umbilical humano) (Sarugaser et al., 2005). La ventaja de utilizar estos tejidos neonatales es su amplia disponibilidad y ausencia de cuestionamientos éticos ya que se utiliza material de descarte. Se ha sugerido también que las MSC obtenidas a partir de tejidos neonatales podrían tener una mayor

capacidad proliferativa, vida útil y un mayor potencial de diferenciación en comparación con las obtenidas a partir de tejidos adultos (Hass et al., 2011).

Potencial terapéutico en enfermedades neurodegenerativas

El potencial terapéutico de las MSC ha sido evaluado en varios modelos de enfermedades neurodegenerativas, mostrando resultados prometedores. En detalle, en un modelo de enfermedad de Huntington inducido por lesión en el estriado con ácido quinolínico, se observó que la lesión promovió que las MSC (provenientes de médula ósea) o células madre neurales (NSC) trasplantadas, se injerten y distribuyan en el estriado y permanezcan de forma masiva hasta 8 semanas después del trasplante. Este efecto no fue evidenciado en un entorno normal, lo cual se adjudicó posiblemente a la falta de expresión de factores que promueven la permanencia de las células madre en la lesión (Bantubungi et al., 2008). Por otro lado, en un modelo doble transgénico de EA, la inyección intracerebral de MSC de cordón umbilical promovió la mejora de la memoria espacial de los animales, disminuyó la carga amiloide y de pTau en los cerebros y promovió cambios en la expresión de citoquinas pro y antiinflamatorias (H. J. Lee et al., 2012)

Sin embargo, la capacidad de las MSC de mejorar el comportamiento y generar cambios en la bioquímica del cerebro afectado sin necesidad de trasplante cerebral fue demostrado por nuestro grupo (Zappa Villar et al., 2020) y en el trabajo de K. S. Kim et al., 2013. Por nuestra parte, hemos demostrado que la inyección intravenosa (iv) de MSC de cordón umbilical humano en el modelo de STZ-icv, mejoró el comportamiento afectado por la STZ, rescató la neurodegeneración de neuronas maduras del hipocampo y moduló la microglía. Kim y colaboradores utilizaron un modelo transgénico de EA, y demostraron que la inyección iv de MSC provenientes de placenta, mejoró la memoria espacial de los animales, lo que se correlacionó significativamente con un nivel menor de placas β A en el cerebro. Adicionalmente, este enfoque logró disminuir la expresión de marcadores proinflamatorios y generó una respuesta en las células microgliales fagocíticas, aumentando su número alrededor de las placas seniles.

Si bien no se conoce el mecanismo por el cual las terapias basadas en células madre podrían ser beneficiosas, es posible que actúan a través de varios mecanismos:

- *terapia de sustitución celular*, mediante trasplante, reemplazando directamente los tipos neuronales perdidos: Las MSC poseen la capacidad para migrar a diferentes áreas dañadas del cuerpo (Assis et al., 2010; Da Fonseca et al., 2009; Oh et al., 2018). Algunos reportes muestran que también pueden generar células de linaje neuronal incluyendo neuronas colinérgicas (L. Zhang et al., 2012) y dopaminérgicas (Barzilay et al., 2008; L. Chen et al., 2009), *in vitro*. Adicionalmente, el trasplante de estas células en cerebro, por ejemplo, también puede estimular el reclutamiento de precursores locales, proliferación y posterior diferenciación en células neurales (Munoz et al., 2005; Uccelli et al., 2008)
- *soporte trófico*, promoviendo la supervivencia celular: Las MSC desempeñan un papel importante como mediadores tróficos, liberando de manera paracrina sustancias que favorecen la protección y regeneración del tejido, como moléculas anti-apoptóticas, antiinflamatorias y factores tróficos tales como el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y el IGF1, etc (Eleuteri & Fierabracci, 2019; Ohtaki et al., 2008). Otros mecanismos implicados en la señalización paracrina promovida por estas células incluyen la transferencia de vesículas extracelulares (microvesículas o exosomas) para células dañadas (Gatti et al., 2011; Lai et al., 2011).

- *modulación de la inflamación*, que puede estar implicada en el proceso de la enfermedad: Las MSC poseen la capacidad de modular la respuesta inmune, pues ejercen un efecto inmunosupresor, inhibiendo la proliferación de los linfocitos T, B y natural killers. Mecanismos contacto-dependientes y la secreción de factores solubles parecen ser parte de la inducción de la inmunosupresión (Ohtaki et al., 2008; Uccelli et al., 2008).

1.6.1.2 *Terapia con secretoma de células madre mesenquimales*

El secretoma (Sc) se define como el conjunto de sustancias liberadas por la célula a su entorno, con un amplio espectro de acción biológica. Esto último se debe a que, como se mencionó antes, el Sc de las MSC incluye citoquinas, quimiocinas, factores de crecimiento, micro RNAs, lípidos, factores antiinflamatorios e incluso proteínas transportadas por vesículas extracelulares de diversos tamaños (Eleuteri & Fierabracci, 2019). El uso del Sc de las MSC, amplía aún más su horizonte terapéutico, dado que se evitan riesgos y efectos secundarios que podría ocasionar el trasplante de estas células. Si bien la terapia con células madre muestra resultados positivos en la investigación preclínica (con modelos animales de diversas enfermedades), la mayoría de los tratamientos en humanos evidenciaron problemas que hacen que su aplicación siga siendo limitada. Entre ellos, el rechazo de las células huésped, la formación de tejido ectópico, su atrapamiento en la microvasculatura con riesgo de trombosis, el riesgo de diferenciación hacia fenotipos malignos y formación de tumores (Eleuteri & Fierabracci, 2019).

Por esta razón, la terapia con Sc celular emerge como una alternativa más segura y probablemente igual de efectiva que la inyección/transplante de células. Por ejemplo, los efectos inmunosupresores de las MSC sobre inmunitipos específicos pueden ser reproducidos por vesículas extracelulares aisladas de sobrenadantes de cultivo de MSC, proporcionando una alternativa válida al uso directo de MSC (Fattore et al., 2015; Martínez et al., 2013).

Algunos estudios han demostrado el efecto beneficioso del Sc de MSC en modelos experimentales de neurodegeneración. Por ejemplo, el Sc administrado de forma iv, mejoró los resultados de test cognitivos y motores de ratas de un modelo de trauma cerebral (Chang et al., 2013). Por otro lado, en un modelo animal de enfermedad de Parkinson se observó que la administración intracerebral del Sc es capaz de modular la supervivencia de neuronas dopaminérgicas en sustancia nigra y sus terminales en el estriado y, atenuar el déficit motor de los animales (Teixeira et al., 2017). A partir de estudios en modelos de isquemia cerebral se ha sugerido que el Sc de las MSC puede promover la reparación a través de una serie de mecanismos que incluyen la prevención de la apoptosis celular, la modulación de la respuesta inflamatoria y la promoción de mecanismos de reparación endógenos como la angiogénesis y la neurogénesis (Cunningham et al., 2018). Por estas razones, y nuestros antecedentes previos con terapia celular (Zappa Villar et al., 2020), evaluar el efecto del Sc de MSC en el modelo de STZ-icv resulta interesante y prometedor.

2 Capítulo II: Hipótesis y objetivos

El objetivo general en el que se enmarca la presente Tesis Doctoral es el desarrollo de estrategias terapéuticas de avanzada que nos permitan prevenir y/o subsanar los cambios neurodegenerativos y el déficit cognitivo asociados a la EA experimental. En este contexto, la terapia con secretoma celular, la terapia génica y el uso de potentes moléculas neuroprotectoras, como el factor de crecimiento similar insulina 1 (IGF1) y antiinflamatorias como la timulina (o factor tímico sérico), emergen como abordajes terapéuticos promisorios. Por otro lado, el estudio de un modelo de EAe en hembras es imprescindible para probar el potencial de la terapia génica y celular propuestas en el presente trabajo.

2.1 Hipótesis

Las hipótesis centrales de la presente tesis son:

- Que la terapia génica con IGF1 constituye una estrategia neuroprotectora efectiva para el tratamiento de neuropatologías. Suponemos que la sobreexpresión del IGF1 *in situ* será neuroprotectora, estimulará la neurogénesis y restaurará el deterioro de la performance cognitiva característico de las ratas del modelo EAe.
- Que la terapia génica con timulina constituye una estrategia promisoriosa para el abordaje de patologías neuroinflamatorias, como la EAe. Suponemos que la sobreexpresión sistémica de timulina modulará la glía, reduciendo su reactividad, y contribuyendo de esta forma a restaurar el deterioro de la performance cognitiva característico de las ratas del modelo EAe.
- Que el efecto neuroprotector de las células madre mesenquimales está mediado por su secretoma y que el efecto benéfico del secretoma se verá potenciado por la simultánea sobreexpresión del IGF1. De esta manera, el secretoma de células madre mesenquimales que sobreexpresen IGF1 constituirá una potente estrategia neuroprotectora y antiinflamatoria efectiva para el tratamiento de neuropatologías. Hipotetizamos que la terapia combinada con el secretoma suplementado será más eficaz que la terapia con secretoma *naïve* en consolidar la memoria y mejorar el comportamiento deteriorado de las ratas del modelo EAe.
- Que las hormonas ováricas de ratas hembra prevendrán el deterioro cognitivo que es normalmente inducido por la STZ en ratas macho, por lo que su depleción mediante ovariectomía aumentará la vulnerabilidad del cerebro a los efectos de la STZ, constituyendo una estrategia efectiva para el desarrollo de un modelo de EAe en hembras.

2.2 Objetivos específicos

1. Caracterizar el modelo de EAe generado mediante inyección de STZ-icv en ratas macho, a los 25 y 95 días post inyección de STZ (modelo de corto y mediano plazo, respectivamente). Evaluar: memoria, y expresión de proteínas marcadoras de EA, microglía reactiva, astrocitos reactivos, y morfometría, en el hipocampo.
2. Implementar terapia génica de corto plazo con IGF1 en ratas macho del modelo de EAe. Administrar la terapia por vía icv, y analizar su impacto en el comportamiento y en el cerebro de los animales a 25 días post STZ-icv.
3. Implementar terapia génica de mediano plazo con timulina en ratas macho del modelo de EAe. Administrar la terapia por vía intramuscular, y analizar su impacto en el comportamiento y en el cerebro de los animales a 3 meses post STZ-icv.
4. Implementar terapia celular con el secretoma de células madre mesenquimales que sobreexpresen o no IGF1, en ratas macho del modelo de EAe. Administrar la terapia por vía intranasal y analizar su impacto en el comportamiento y en el cerebro de los animales a 3 meses post STZ-icv.
5. Evaluar si la administración de STZ a corto plazo genera un modelo de EAe en ratas hembra. Adicionalmente, estudiar si la depleción de hormonas ováricas mediante ovariectomía incrementa la vulnerabilidad de las ratas a la STZ. Analizar: comportamiento, expresión de proteínas marcadoras de EA, microglía reactiva, neuronas inmaduras y morfometría, en el hipocampo.
6. Comparar el efecto de la STZ-icv entre ratas macho y hembra, con y sin ovarios, en el comportamiento, la reactividad astrocítica, las sinapsis y las neuronas inmaduras en el hipocampo.

3 Capítulo III: Materiales y métodos

3.1 Preparación de estreptozotocina

El día de la inyección icv se preparó una solución de STZ (Sigma-Aldrich, CAS 18883-66-4), disolviendo la droga en LCR artificial (LCRa) estéril (120 mM NaCl, 3 mM KCl, 1,15 mM CaCl₂, 0,8 mM MgCl₂, 27 mM NaHCO₃ y 0,33 mM NaH₂PO₄, pH 7,4). Las ratas del grupo experimental STZ recibieron una inyección bilateral icv de STZ en dosis 3mg/kg de peso corporal, mientras que las ratas del grupo control (Sham) recibieron 5 ul/ventrículo de LCRa.

3.2 Vectores adenovirales

3.2.1 Vector RAd-IGF1

Vector adenoviral recombinante portador del cDNA del gen IGF1 de rata, construido previamente en nuestro laboratorio (Hereñú et al., 2007). El transgén se encuentra bajo el control del promotor del citomegalovirus murino (**Fig. 10A**).

3.2.2 Vector RAd-metFTS

Vector adenoviral recombinante portador del gen sintético para timulina (metFTS) de rata, previamente construido en nuestro laboratorio (Reggiani et al., 2006). El transgén se encuentra bajo el control del promotor del citomegalovirus murino (**Fig. 10B**).

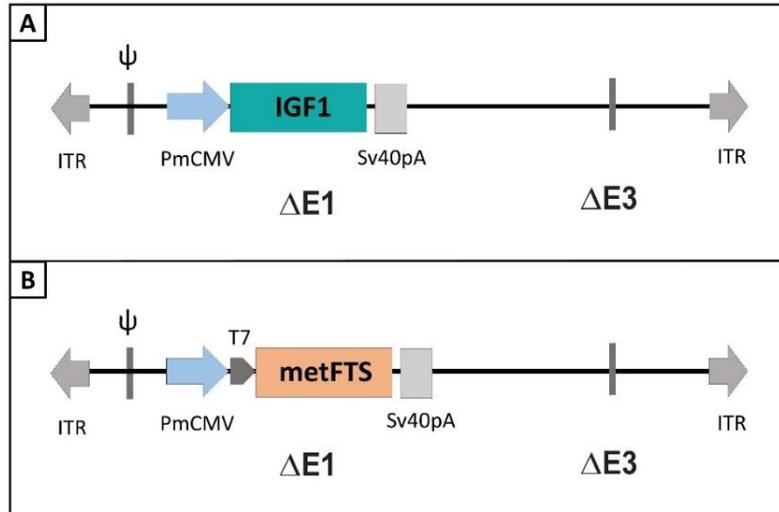


Figura 10: Representación esquemática de los vectores RAd-IGF1 y Rad-metFTS. Esquema del vector RAd conteniendo el gen IGF1 de rata (A) y el gen de un análogo biológico de la timulina, met-FTS (B). Abreviaturas: ITR, repetición terminal invertida; PmCMV, promotor mínimo de citomegalovirus; Sv40pA, señal de poliadenilación del virus simio 40; ΔE1 y ΔE3, deleciones en el genoma; ψ, señal de empaquetamiento, T7 promotor del fago T7.

3.2.3 Amplificación y titulación de los vectores

El inóculo inicial de los vectores adenovirales se amplificó infectando monocapas de células HEK 293 con una confluencia del 90%, utilizando el stock madre viral conservado a -80 °C. Las células fueron

cultivadas en MEM (Minimum Essential Medium) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% (Natocor), antibiótico y antimicótico (ATB/ATM) (Anti-Anti 100X, Gibco, #15240-062) y ciprofloxacina al 5% (medio de mantenimiento completo). Luego de 24 horas, se observó efecto citopático (CPE) en toda la monocapa, se recogió el medio con las células que se encontraban flotando, y se despegaron cuidadosamente por raspado las células que todavía permanecían adheridas a la base de las botellas. Las células se centrifugaron a 1000 rpm y el sedimento celular fue resuspendido en un menor volumen. Las partículas virales fueron liberadas al medio mediante la lisis de las células por congelamiento y descongelamiento repetido de las mismas (3 veces). Luego, se centrifugó a 1000 rpm durante 10 minutos y se obtuvo un sobrenadante (lisado crudo) conteniendo la progenie del RAd-metFTS y del Rad-IGF1 generados. Se guardó a -80°C hasta su purificación.

La purificación de las partículas virales se realizó mediante dos ultracentrifugaciones sucesivas en gradiente de CsCl. Ambas ultracentrifugaciones se llevaron a cabo en una ultracentrífuga Beckman Coulter modelo L7-65, con el rotor SW-60Ti (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, EEUU). La primera centrifugación se realizó en un gradiente discontinuo de CsCl, en tubos de policarbonato estériles de 4,4 ml de capacidad. Se depositaron sucesivamente, desde el fondo, las siguientes soluciones de CsCl: 0,2 ml de densidad 1,5 g/ml, 1,1 ml de densidad 1,35 g/ml y 1,35 ml de densidad 1,25 g/ml; a continuación se colocó en la superficie 2 ml de la suspensión de partículas virales y se centrifugó a 45000 rpm durante 1 hora a 18°C . Al finalizar la ultracentrifugación se pudo observar una banda blanquecina correspondiente a las partículas virales, a una densidad aproximada de 1,35 g/ml. Se recogió dicha banda y se la depositó (1 ml de la suspensión de partículas virales) sobre 3,4 ml de una solución de CsCl de densidad 1,35 g/ml. A continuación se realizó una segunda ultracentrifugación a 45000 rpm durante 18 horas a 4°C . Se recogió la banda correspondiente a la suspensión viral y se dializó durante 18 horas a 4°C contra una solución de buffer Tris-HCl 10 mM (pH 7,5), NaCl 135 mM, Cl_2Mg 1 mM. A las preparaciones virales se le adicionó 10% de glicerol y se conservó a -70°C hasta su titulación y fraccionamiento.

La titulación de los vectores adenovirales fue realizada mediante el método de dilución por placas. Se sembraron placas de cultivo con células HEK 293 en medio de mantenimiento completo. Cuando las monocapas alcanzaron un 60% de confluencia, se cambió el medio de mantenimiento de cada pocillo a un medio sin suero, y se infectaron, por triplicado con 200 μl de diluciones crecientes (desde 1×10^{-5} hasta 1×10^{-14}) de la preparación viral purificada. Como control negativo se utilizaron células sin infectar. Luego de 1 hora a 37°C , se agregó medio de mantenimiento completo. Aproximadamente una semana post-infección se observó el CPE, y en la última dilución con CPE, se contaron las placas de lisis. Se calculó el título viral (Precious B & Russell WC, 1985) a partir del número de las placas de lisis contadas y de la dilución donde se determinaron, obteniéndose el título como unidades formadoras de placa/ml (ufp/ml).

3.3 Obtención del secretoma de células madre mesenquimales

Para obtener el Sc de MSC, las células fueron aisladas a partir de tejido perivascular de cordón umbilical humano obtenido de donantes sanos en el Hospital Universitario Austral (Pilar, Buenos Aires, Argentina) como se describió en el trabajo de (Bayo et al., 2014). Las células se caracterizaron de acuerdo con las directrices de la Sociedad Internacional de Terapia Celular (Dominici et al., 2006), como se describió previamente (Aquino et al., 2010).

Las MSC se cultivaron con medio MEM suplementado con SFB FRA (Internegocios) al 15%, glutamina 2mM, ATB/ATM y ciprofloxacina (0,5%). Una vez logrado un 80% de confluencia de 4 botellas 175 cm², la mitad fueron transducidas con el vector RAd-IGF1 para obtener sobrenadante enriquecido en IGF1. Para ello, se eliminó el medio de cultivo de las células y se agregó medio MEM α con todos sus aditivos excepto SFB, y 1,6 x10⁸ ufp/botella. Las células se incubaron en esta condición durante 48 h. Luego de transducidas, se recuperó el sobrenadante de cada botella sin despegar las células, y se centrifugó a altas rpm. Se estableció el anterior protocolo teniendo en cuenta antecedentes de transducción de MSC de médula ósea con el vector RAd-IGF1 descrito en la **sección 3.2.1**, en el cual se observó un incremento significativo de IGF1 en el sobrenadante celular a 2 días post infección, respecto al control (Fiore et al., 2015). Para obtener el Sc naïve, se realizó el mismo procedimiento con botellas confluentes, sin adicionar el vector RAd-IGF1.

3.4 Procedimientos en animales

3.4.1 Animales

Los experimentos se realizaron en ratas macho y hembra *Sprague Dawley*. Los animales se alojaron en jaulas a temperatura controlada (22-24 °C) con un ciclo de 12 h de luz/12 h de oscuridad (luces encendidas de 7 a.m. a 7 p.m.) disponiendo comida y agua *ad libitum*. Previo a la realización de los experimentos, los mismos fueron revisados y aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Ciencias Médicas, UNLP (# T10-01-2013; #P03-03-2016; #T01-04-2019; #P02-02-2020).

3.4.2 Cirugías estereotáxicas

Todas las ratas fueron sometidas a cirugías estereotáxicas al cumplir los 3 meses de edad. Los procedimientos se realizaron en condiciones de asepsia utilizando el material adecuado limpio y esterilizado. En todos los casos, las ratas fueron anestesiadas con una inyección intraperitoneal (ip) con una mezcla de clorhidrato de ketamina (90 mg/kg de peso corporal) y xilacina (8 mg/kg de peso corporal), previo a ser situadas en un aparato estereotáxico (**Fig. 11A**), sobre almohadillas térmicas para evitar el descenso de temperatura corporal como consecuencia de la anestesia. Para su colocación en dicho aparato, se colocó en el oído de los animales el anestésico local clorhidrato de lidocaína al 2%. A continuación, se cortó el pelo de los animales y se desinfectó el cuero cabelludo con etanol al 70%. Se realizó una incisión en la piel de la calota y luego de visualizar el bregma, se establecieron las coordenadas de inyección. Las coordenadas estereotáxicas para la inyección icv (**Fig. 11B**) en machos fueron: 0,92 mm posterior al bregma, 1,5 mm lateral a la sutura sagital y -3,9 mm por debajo de la superficie cerebral. Las coordenadas para la inyección icv en hembras fueron: 0,8 mm posterior al bregma, 1,5 mm lateral a la sutura sagital y -3,9 mm por debajo de la superficie cerebral (Paxinos & Watson, 2007). Al finalizar el procedimiento, el cuero cabelludo de las ratas fue suturado y tratado con iodopovidona al 10%. Finalmente, los animales recibieron una inyección analgésica de clorhidrato de tramadol (10 mg/kg de peso corporal, subcutáneo).

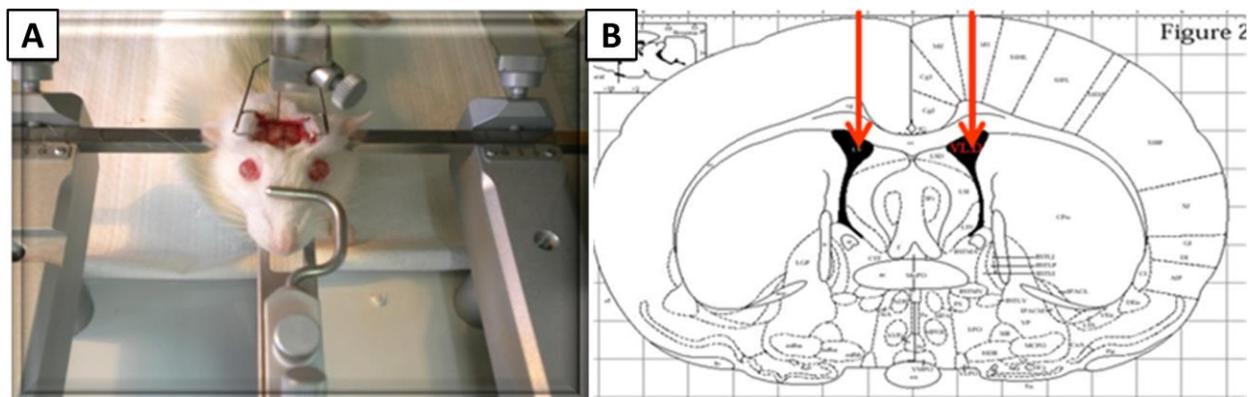


Figura 11: **Inyección estereotáxica intracerebroventricular.** Rata anestesiada en aparato estereotáxico (A). Esquema extraído del atlas “The Rat Brain in stereotaxic coordinates” (Paxinos & Watson, 2007), mostrando el sitio de inyección en los ventrículos laterales (flechas rojas) (B).

3.4.3 Ovariectomía

Las ratas fueron anestesiadas con un vaporizador de Isoflurano (Ohio Medical Products, Serial n° AKDK03089). Una vez comprobada la correcta inducción del estado de anestesia, se procedió a realizar la ovariectomía bilateral. Se rasuró y desinfectó la zona a operar, y luego se realizó una incisión longitudinal de aproximadamente 1 cm en el área de la línea media de la región pre-púbica, desde donde se extirparon ambos ovarios y se reintrodujeron los cuernos uterinos. Finalmente, se procedió al cierre de la incisión con suturas absorbibles y se desinfectó la zona con iodopovidona. Para mantener la temperatura corporal, se situó cada animal sobre una almohadilla térmica durante el desarrollo de la intervención quirúrgica.

3.4.4 Inyección intramuscular

Los animales fueron anestesiados con un vaporizador de Isoflurano (Ohio Medical Products, Serial n° AKDK03089). Las inyecciones se llevaron a cabo en la región lateral del muslo (bíceps femoral) de la pata derecha (primera inyección) e izquierda (segunda inyección), sitio que fue previamente rasurado y desinfectado con etanol al 70%. Luego, se realizó una incisión en la piel de menos de 1 cm de largo para exponer el músculo, y se inyectó de manera lenta y controlada, un total 100 µl de la solución viral, en tres puntos distintos del músculo. A continuación, se suturó el corte cutáneo y se trató con iodopovidona. La solución viral fue preparada en solución salina esterilizada, y se inyectaron $6,42 \times 10^8$ pfu del vector Rad-metFTS por animal.

3.4.5 Instilación intranasal

Para realizar la administración intranasal de sobrenadante celular, se utilizó un vaporizador de Isoflurano (Ohio Medical Products, Serial n° AKDK03089). Las ratas fueron colocadas en posición supina y una almohadilla fue insertada bajo el cuello dorsal para extender la cabeza hacia atrás. Un total de 120 µl de Sc obtenido de las MSC naïve o transducidas con el vector RAD-IGF1 fue administrado con una micropipeta, en 20 µl por narina, alternando entre cada narina cada 2-3 min. Las ratas control recibieron la misma cantidad de solución salina estéril.

3.4.6 Peso corporal

A partir de cumplido 1 mes de edad, las ratas fueron pesadas periódicamente con el objetivo de monitorear su crecimiento, descenso y recuperación de peso después de los procedimientos en animales. Además, durante los momentos de pesaje se practicaron distintas técnicas de sujeción para generar un acostumbramiento de las ratas a la manipulación humana y evitar estrés en los días de cirugía o test comportamentales.

3.4.7 Test de comportamiento

3.4.7.1 *Comportamiento típico de especie*

El test de enterramiento de canicas (MB, del inglés “*marble burying*”) permite evaluar el comportamiento típico de especie, ya que se ha demostrado que los roedores naturalmente entierran objetos no nocivos cuando estos se colocan en su territorio (de Brouwer et al., 2019; Poling et al., 1981). Esta prueba se realizó en cajas de mantenimiento de 30×30×17 cm (ancho x profundidad x altura) con 5 cm de viruta limpia apisonada. En la superficie se colocaron 16 bolitas de vidrio del mismo color, de 1,5 cm de diámetro, espaciadas de manera uniforme en un patrón de 4 x 4 (**Fig. 31A**). Ratas individuales se colocaron en la caja de testeo durante 30 min. Luego, dos experimentadores ciegos al tratamiento realizaron el conteo de bolitas enterradas $\geq 2/3$ de su tamaño. Para cada rata, se utilizó una nueva cama de viruta y bolitas desodorizadas con una solución de etanol al 70%.

3.4.7.2 *Comportamiento exploratorio y de ansiedad*

El test de campo abierto (CA) permite evaluar sistemáticamente la exploración de un ambiente nuevo y el comportamiento relacionado con la ansiedad en roedores (Crusio, 2001; R. N. Walsh & Cummins, 1976). Existen dos factores que influyen en el comportamiento ansioso durante el CA; el primero es el aislamiento social resultante de la separación física de los animales de una misma jaula cuando se realiza la prueba. El segundo, el estrés creado por el entorno de prueba iluminado y desconocido. El test se realizó en una caja cuadrada de madera de color negro de 65×65×45 cm (ancho x profundidad x altura). El piso de la caja se encuentra dividido en 16 cuadrados iguales de 16 × 16 cm. Las ratas se colocaron en el centro de la arena y se les permitió explorar libremente durante 5 min. La arena abierta se limpió cuidadosamente con etanol al 10% después de cada prueba individual para eliminar las señales olfativas. El comportamiento para esta prueba y para todas las siguientes se registró utilizando una videocámara (Logitech C922 Pro) para su posterior análisis. Las variables de comportamiento fueron: **a) Grooming**: tiempo invertido por la rata en acicalarse, asearse o rascarse; **b) Crossing**: número de líneas de la cuadrícula cruzadas por la rata con sus cuatro patas; **c) Rearing**: tiempo que la rata pasa explorando parada sobre sus patas traseras; **d) Entradas en área central**: número de entradas de la rata con sus cuatro patas al área central de la arena; **e) Tiempo en el área central**: tiempo que la rata permanece en área delimitada como área central.

3.4.7.3 *Memoria de reconocimiento*

El test de reconocimiento de objeto (RO), es una prueba utilizada para evaluar la memoria de reconocimiento a distintos tiempos (Antunes & Biala, 2012). Esta prueba constó de tres fases:

- *Habitación:* El test de CA fue la etapa de habitación del RO, ya que se realiza 24 h antes del test RO. Los animales exploraron libremente la caja/arena, la misma que fue luego utilizada para continuar con las dos etapas restantes descriptas a continuación.

- *Entrenamiento (RO 1):* Al día siguiente, cada animal fue colocado en el centro de la caja en presencia de dos objetos idénticos, luego llamados objetos “familiares” (Objetos F), y se midió el tiempo de exploración de los mismos durante 3 minutos.

- *Reconocimiento:* Para evaluar la memoria de reconocimiento a 90 minutos (RO 2), cada rata fue colocada nuevamente en la caja luego de 90 minutos de transcurrido el RO 1, esta vez en presencia de un objeto F y un objeto nuevo y diferente (Objeto N). Las ratas fueron dejadas en la caja durante 3 minutos, durante los cuales se cuantificó el tiempo de exploración de ambos objetos. Para evaluar la memoria de reconocimiento a 24 horas (RO 3), los animales fueron colocados en la caja luego de 24 horas de transcurrido el RO 1. Para el RO 3 se colocó un objeto F y un objeto N diferente al empleado para el RO 2. De la misma manera, las ratas fueron dejadas 3 minutos en la caja. Con el tiempo de exploración de cada objeto, se calculó el porcentaje de exploración del objeto F y del objeto N, y el índice de discriminación (I.D.), como la diferencia en el tiempo de exploración del objeto F y N sobre el tiempo total de exploración de ambos objetos [$I.D. = (tN - tF)/(tN + tF)$]. Una puntuación positiva en el I.D. indica más tiempo dedicado a explorar el objeto novedoso, una puntuación negativa indica más tiempo dedicado al objeto familiar, y una puntuación cero indica una preferencia nula por los objetos.

3.4.7.4 Memoria espacial

Realizamos el LB para evaluar memoria espacial (C. A. Barnes, 1979; Suzuki & Imayoshi, 2017). Se utilizó una plataforma circular de acrílico negro, de 122 cm de diámetro, con 20 agujeros en su periferia (de 10 cm de diámetro, numerados en **Fig. 24E**), y elevada a 108 cm del suelo. El cuarto de testeo contenía cuatro señales visuales alrededor de la plataforma, y un generador de ruido blanco de 90 dB y una bombilla de luz blanca de 500 W proporcionaron los estímulos de escape. Durante los ensayos de adquisición, solo uno de los agujeros (agujero 0) se encontraba conectado a una caja de escape negra removible (38,7 cm x 12,1 cm x 14,2 cm). Las ratas se colocaron en posición aleatoria en el centro de la plataforma. Durante todo el experimento, el agujero 0 permaneció en un lugar fijo para evitar la aleatorización de la posición relativa de la caja de escape. El LB implicó tres fases:

- *Habitación:* los animales fueron habituados a la plataforma y la caja de escape durante 2 min en cada dispositivo.

- *Adquisición de la memoria:* Al día siguiente de la habitación, se realizaron seis ensayos idénticos de adquisición de memoria, repartidos en tres días. Durante estos ensayos, las ratas exploraron libremente la plataforma durante un máximo de 120 s, en presencia de los estímulos aversivos, los cuales fueron apagados una vez que el animal encontró y se refugió en la caja de escape.

- *Prueba de la memoria (PT, del inglés “probe trial”):* durante esta prueba se eliminó la caja de escape y las ratas exploraron la plataforma durante 120s con el objetivo de evaluar su retención de memoria espacial.

Las superficies del laberinto, el cilindro de inicio y la caja de escape se limpiaron con etanol al 10 % después de cada prueba para eliminar las señales olfativas. Los parámetros de comportamiento evaluados durante el PT fueron los siguientes: **a) Latencia:** Tiempo empleado por un animal desde su liberación de la cámara de inicio hasta la primera exploración del agujero de escape; **b) Errores:** Número

de exploraciones de agujeros diferentes al agujero de escape, hasta la primera exploración de dicho agujero; **c)** *Frecuencia de exploración en el sector meta (GS, del inglés Goal Sector)*: número de exploraciones de los agujeros -1, 0 y 1, dividido por el número de exploraciones de todos los agujeros; **d)** *Porcentaje de exploración del agujero 0 sobre el total de exploraciones*; **e)** *Tiempo de permanencia en cuadrante meta*: Tiempo que el animal permanece en el cuadrante comprendido por los agujeros -2, -1, 0, 1, 2.

3.4.7.5 *Comportamiento similar depresivo*

El test de nado forzado (NF), se usa para probar el comportamiento depresivo (Bogdanova et al., 2013; Detke et al., 1995). Esta actividad se llevó a cabo en un tanque de agua (25 °C, 40 cm de profundidad, 30 cm de diámetro). En el primer día de pruebas, las ratas fueron expuestas al tanque de agua durante 15 minutos (prueba previa). Luego de 24 h, se realizó una prueba idéntica de 5 min. Los datos se analizaron por cuantificación de tiempo de nado o por una técnica de muestreo. Para la primera, se calculó el tiempo durante el cual el animal realizó comportamiento activo (intento de escape del tanque) y el tiempo de inmovilidad. Para la técnica de muestreo, se determinó el comportamiento (activo o inmovilidad) en cada período de 5 s de la prueba de 300 s. Esto proporcionó un total de 60 puntuaciones.

3.4.8 *Eutanasia y obtención de cerebros*

Para los objetivos 1, 2, 3, 4 y 5, la eutanasia de las ratas se llevó a cabo mediante decapitación rápida, previa anestesia de los animales con xilacina y ketamina, al igual que para las cirugías estereotáxicas. Los cerebros se extrajeron rápidamente y se dividieron ambos hemisferios. El hemisferio izquierdo se fijó en paraformaldehído (PFA) al 4% preparado en buffer fosfato (PB) 0,1M (pH 7,4), durante una noche a 4°C. Luego de 24 h, los cerebros se conservaron en una solución crioprotectora de 30% de etilenglicol y 30% de sacarosa, en PB 0,1 M (pH 7,4) a -20°C, hasta su uso para inmunohistoquímica (IHQ). Para ello, el hemisferio izquierdo se cortó coronalmente en secciones de 40 µm de grosor con un vibrátomo (VT1000S; Leica Microsystems), separando los cortes en seis series. En estas series el hipocampo dorsal se encontraba representado entre 5 y 7 cortes; cada serie fue utilizada para distintos experimentos de IHQ. En el hemisferio derecho, el hipocampo y la corteza fueron disecados y almacenados a -80 °C para su posterior uso en Western Blot (WB).

Para llevar a cabo el objetivo 6, la eutanasia de las ratas se llevó a cabo mediante perfusión intracardiaca utilizando una bomba peristáltica (Gilson). Los animales se anestesiaron con xilacina y ketamina, y se expuso la región torácica y la cavidad peritoneal para acceder al corazón. Luego, se canuló el ventrículo izquierdo (con aguja 18 G), y se efectuó un pequeño corte en la aurícula derecha para permitir el drenaje del sistema vascular al final del circuito. Durante la perfusión, la bomba peristáltica impulsa el fijador (PFA al 4%) que ingresa a la circulación del animal por el ventrículo izquierdo, baña los tejidos y emerge por la aurícula derecha. Se perfundió a una velocidad de 8.25 ml/min, primero pasando 200 ml de PBS y finalmente, 250 ml de PFA 4%. Subsecuentemente, los animales se decapitaron con una guillotina, el cerebro se disecó cuidadosamente y se dejó en solución fijadora durante toda la noche. Al día siguiente los cerebros se transfirieron a la solución criopreservadora, se mantuvieron en ella durante un mínimo de 24 h a 4°C y luego se guardaron a -20°C hasta ser cortados para experimentos de inmunofluorescencia (IF), como se describió para los cortes de IHQ.

3.5 Procesamiento de las muestras

3.5.1 Anticuerpos

A continuación, se detallan los anticuerpos utilizados para las técnicas de IHQ, IF y WB (**Tabla 1**)

Tabla 1: Lista de anticuerpos primarios y secundarios utilizados, y diluciones según sus aplicaciones. Abreviaturas: IHQ: inmunohistoquímica; IF: inmunofluorescencia; WB: Western Blot; HRP: peroxidasa de rábano.

Epítipo	Marcaje	Huésped	Referencia	Dilución		
				IHQ	IF	WB
β -actina	Control de carga	Ratón	Santa Cruz Biotechnology, sc-47778			1:1000
Residuos 672-714 de APP	Péptido β A	Ratón	Santa Cruz Biotechnology, sc-28365			1:200
Akt1	Vía de señalización insulina/IGF1	Ratón	Santa Cruz Biotechnology, sc-5298			1:200
Bassoon	Proteína presináptica	Ratón	Abcam, ab82958		1:800	
DCX	Neuronas inmaduras	Cabra	Santa Cruz Biotechnology, sc-8066	1:1000		
GAD 65/67	Enzima sintetizadora de GABA	Ratón	Santa Cruz Biotechnology, sc-365180			1:200
GAPDH	Control de carga	Ratón	Millipore, MAB374			1:10000
GFAP	Astroцитos	Conejo	DAKO, Z0334	1:1500		
GFAP-cy3	Astroцитos	Ratón	Sigma Aldrich, C9205		1:5000	
GLT1	Transportador de GLU en astroцитos	Conejo	Anticuerpo del grupo de la Dra. Carole Escartin		1:2000	
Homer	Proteína postsináptica	Conejo	Synaptic System, #160003		1:400	
Iba1	Microglía	Conejo	Wako Chemicals, #016-20001	1:1000		
IGF1R α	Subunidad α del receptor de IGF1	Ratón	Santa Cruz Biotechnology, sc-463			1:200
IGF1R β	Subunidad β del receptor de IGF1	Ratón	Santa Cruz Biotechnology, sc-390130			1:200
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible	Ratón	Sigma-Aldrich, N9657			1:500
Kir 4.1	Canal de K ⁺ en astroцитos	Conejo	Alomone labs APC_0.35		1:3000	

Epítoto	Marcaje	Huésped	Referencia	Dilución		
				IHQ	IF	WB
NeuN	Neuronas maduras	Ratón	Millipore, MAB377	1:850		
nNOS	Óxido nítrico sintasa neuronal	Conejo	BD Transduction Laboratories, #610310			1:150
pAkt (Ser473)	Enzima Akt fosforilada	Ratón	Santa Cruz Biotechnology, sc-293125			1:200
PSA-NCAM	Neuronas inmaduras	Ratón	Chemicon, AB5324		1:600	
PSD95	Proteína postsináptica	Ratón	Santa Cruz Biotechnology, sc-32290			1:200
pTau (Ser396)	Tau fosforilada	Conejo	Santa Cruz Biotechnology, sc-101815			1:200
pTau (Thr231)	Tau fosforilada (AT180)	Ratón	Thermo Fisher Scientific, #MN1040			1:500
STAT3 α	Vía de señalización JAK/STAT3	Conejo	Cell Signalling, #8768p		1:500	
SV2	Proteína presináptica	Ratón	Developmental Studies Hybridoma Bank, SV2			1:300
Syt2	Proteína presináptica	Ratón	Developmental Studies Hybridoma Bank, Znp-1			1:150
Vinculina	Control de carga	Ratón	Santa Cruz Biotechnology, sc-73614			1:200
Tau	Proteína asociada a microtúbulos	Ratón	Developmental Studies Hybridoma Bank, 5A6			1:150
IgG raton	Anticuerpo 2 ^{rio} biotinilado	Cabra	Vector Laboratories, BA-9200	1:300		
IgG conejo	Anticuerpo 2 ^{rio} biotinilado	Cabra	Vector Laboratories, BA-1000	1:300		
IgG cabra	Anticuerpo 2 ^{rio} biotinilado	Caballo	Vector Laboratories, BA-9500	1:300		
IgG raton	Anticuerpo 2 ^{rio} -HRP	Cabra	Jackson Immuno Research Laboratories, #115-035-003			1:20000
IgG conejo	Anticuerpo 2 ^{rio} -HRP	Cabra	Thermo Fisher Scientific, #32460			1:5000
IgG raton	Anticuerpo 2 ^{rio} -AlexaFluor	Cabra	Invitrogen		1:1000	

Epítotope	Marcaje	Huésped	Referencia	Dilución		
				IHQ	IF	WB
IgG conejo	Anticuerpo 2 ^{ri} o-AlexaFluor	Burro	Invitrogen		1:1000	

3.5.2 Inmunohistoquímica

Para cada experimento de IHQ, se seleccionaron los cortes de interés de una de las seis secciones seriadas. Los cortes coronales fueron lavados en solución de lavado (albúmina de suero bovino [BSA] al 10%, Triton X-100 al 0,4%, PB 0,1 M) para eliminar excedentes de la solución criopreservadora. Luego, se realizó un paso de bloqueo de la enzima peroxidasa endógena (50% metanol, 10% H₂O₂ 30 vol, 15 min a temperatura ambiente) y un bloqueo general del tejido para evitar uniones inespecíficas con los anticuerpos (10% suero normal de caballo, 1% BSA, 1 h a temperatura ambiente). Tras una incubación de una noche a 4°C con el anticuerpo primario (anticuerpos y diluciones en **Tabla 1**), las secciones se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente, conjugado a biotina, durante 120 min. Posteriormente, se enjuagaron e incubaron con el complejo avidina-biotina-peroxidasa (1:500; Vector Laboratories, Cat#PK-6100) durante 90 min, o con streptavidina-HRP (1:2000; Abcam, ab740) durante 15 min. Finalmente, las secciones se incubaron durante 5 min con 3,3-diamino benzidinetetrahidrocloruro (Nacalai Tesque Inc, Lot. M4M3918, #110-09) o VIP (Vector Laboratories, Cat#SK-4600) y la reacción fue cortada con el agregado de agua corriente. Las secciones se montaron y se contra tiñeron con Nissl (solución de violeta de cresilo al 0,5 %) mediante una inmersión de los portaobjetos durante 15 s. A continuación, los cortes fueron deshidratados en alcoholes (etanol y xilol) y montados con Bálsamo de Canada (Biopack, Cod. 1302.06) para su visualización en el microscopio. Los anticuerpos utilizados se encuentran especificados en la **Tabla 1**.

3.5.3 Inmunofluorescencia

Las secciones se enjuagaron tres veces en PBS 0,1M, durante 10 min. A continuación, se bloquearon con suero normal de cabra (NGS) al 5% en PBS 0,1M y Tritón X-100 al 0,2% (PBST), durante 1h a temperatura ambiente. Las secciones se incubaron durante una o dos noches (dependiendo el anticuerpo) a 4°C con las soluciones de anticuerpos primarios diluidas en una solución NGS al 3% en PBST (anticuerpos y diluciones en **Tabla 1**). Posteriormente, las secciones se enjuagaron tres veces en PBS 0,1M, durante 10 min y se incubaron con anticuerpos secundarios fluorescentes apropiados en la misma solución que los anticuerpos primarios, durante 2 h a temperatura ambiente. A continuación, se volvieron a repetir pasos de lavado antes de incubar con el marcador fluorescente de núcleos DAPI (1:5000; Sigma, D9564) durante 15 min a temperatura ambiente. Finalmente, las secciones se montaron en portaobjetos SuperFrost™ Plus Adhesion (Eprelia, J1800AMNZ) con medio de montaje Fluorsave™ (Calbiochem, #345789).

Excepciones a este protocolo se realizaron para el marcaje de STAT3α y de las proteínas sinápticas Bassoon y Homer. Para STAT3α, las secciones se pretrataron con metanol al 100%, durante 10 min a -20°C, y luego fueron enjuagadas y bloqueadas durante 1h en BSA al 3% preparada en PBST. A continuación, se incubaron con el anticuerpo primario anti-STAT3α preparado en el diluyente de anticuerpos Signal Stain® (Cell signaling, #8112L), durante 72 h a 4°C. Después de enjuagues, los cortes se

incubaron con el anticuerpo secundario apropiado diluido en BSA al 1% en /PBST, durante 2 h a temperatura ambiente. Para la doble inmunofluorescencia de las proteínas sinápticas, los cortes fueron lavados tres veces en PBS 0,1M durante 10 min, y luego permeabilizados con PBS 0,1M en Triton X-100 al 0,5% durante 15 min. A continuación, se realizó una incubación secuencial de los cortes con ambos anticuerpos primarios, cada uno por 48 h a 4°C. Luego de la incubación con los anticuerpos secundarios correspondientes, los cortes se montaron con medio de montaje Vectashield (Vector Laboratories) y fueron cubiertos con cubreobjetos de alta precisión de $170 \pm 5 \mu\text{m}$, N° 1,5H.

3.5.4 Obtención y análisis de imagen

Las imágenes se obtuvieron de secciones seriadas a lo largo del eje antero-posterior del hipocampo dorsal (**Fig. 12**), ubicado entre las coordenadas -2,92 mm y -4,68 mm desde el bregma (Paxinos & Watson, 2007). La obtención de imágenes de IHQ se realizó con un microscopio Olympus BX-51 acoplado a una cámara de vídeo Olympus DP70 (Tokio, Japón). La obtención de mosaicos con fluorescencia se realizó con un microscopio de epifluorescencia equipado con una platina motorizada (Leica DM6000, Nussloch, Alemania). Para el análisis de STAT3 y de la colocalización de las proteínas Bassoon y Homer, se utilizó un microscopio láser confocal (SP-8, Leica). El análisis de imagen se llevó a cabo usando el software Image ProPlus v5.1 (IPP, Media Cybernetics) y el software ImageJ (NIH).

3.5.4.1 Análisis de neuronas maduras en el hipocampo

Una disminución del área inmunorreactiva (IRA) de NeuN se estableció como criterio de neurodegeneración. Para esta evaluación, se utilizaron imágenes obtenidas con un objetivo de inmersión (100X), de la capa granular del GD del hipocampo dorsal, de tres campos por sección y por animal. Las imágenes se segmentaron digitalmente utilizando el software Image ProPlus v5.1 (IPP, Media Cybernetics). Para cada cálculo, el fondo se determinó ajustando manualmente la ventana de densidad del sistema hasta que sólo se seleccionaron las neuronas NeuN inmunomarcadas. Para cada animal, se realizó la sumatoria del IRA de cada campo, y se normalizó por el número de secciones analizadas.

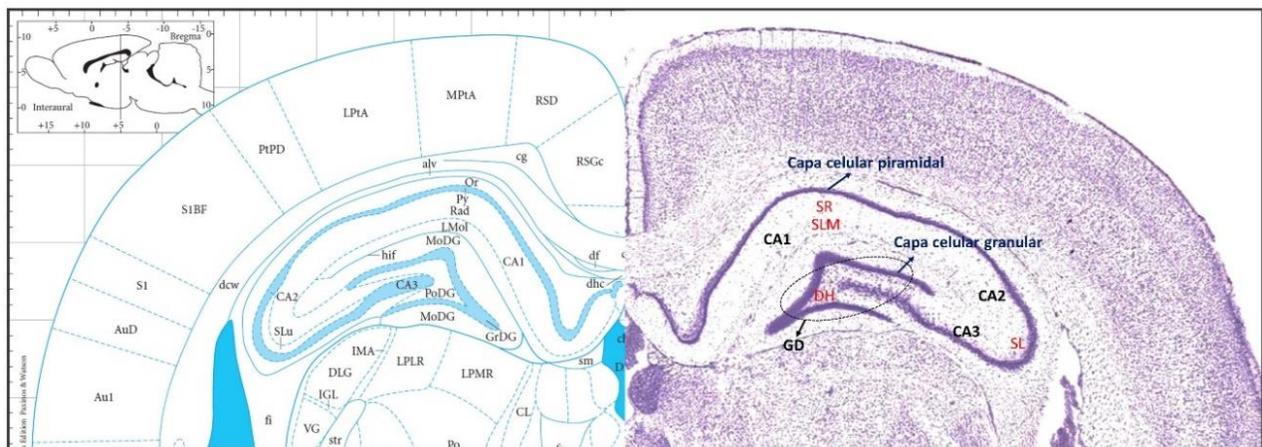


Figura 12: Corte coronal del cerebro de rata, imágenes adaptadas del atlas “The Rat Brain in stereotaxic coordinates”. Hemisferio izquierdo mostrando esquema del hipocampo dorsal, en coordenada -3,96 mm respecto al bregma (Paxinos & Watson, 2007). Hemisferio derecho con tinción Nissl. Abreviaturas: CA1, Cornu Ammonis 1; CA2, Cornu Ammonis 2; CA3, Cornu

Ammonis 3; GD, giro dentado; DH, Dentate Hilus; SLM, *Stratum Lacunosum Moleculare*; SR, *Stratum Radiatum*; SL, *Stratum Lucidum*.

3.5.4.2 Volumen del SR y de la capa granular del GD

Con el fin de evaluar el volumen del *Stratum Radiatum* (SR) y de la capa granular del GD se realizó un enfoque estereológico en cortes coronales del hipocampo dorsal. El volumen se estimó empleando el método de Cavalieri (West & Gundersen, 1990) ($volumen = t \times \sum A_i$, en donde t es la distancia entre las secciones y $\sum A_i$ representa la suma de áreas de cada sección). Las medidas fueron realizadas en imágenes inmunomarcadas para NeuN o teñidas con Nissl, ya que estos marcajes permiten visualizar bien las capas piramidal y granular del hipocampo (**Fig. 12**), para delimitar las áreas de interés. Para el SR, nuestra región de interés se estableció como el área delimitada por la capa piramidal CA1 como límite superior, el *Stratum Lacunosum Moleculare* (SLM) como límite inferior y un ancho fijo de 520 μm como límite lateral cuyo punto medio fue el punto máximo de curvatura de la capa piramidal. Para la capa granular del GD, se usaron imágenes del GD en mosaico adquiridas con un objetivo de 20x, y se seleccionó como región de interés (ROI) la capa granular en toda su extensión. La distancia de separación entre las secciones muestreadas fue de 240 μm en el eje anterior-posterior.

3.5.4.3 Análisis de neuronas inmaduras en el hipocampo

La expresión de neuronas inmaduras en el GD se estudió mediante el marcaje de DCX y de la forma polisialilada de la molécula de adhesión celular neural (PSA-NCAM). Se contabilizó el número de células positivas (marca en el soma y en prolongación principal) de ambos marcadores en el GD, más específicamente en la capa granular y la SGZ del mismo. El recuento se realizó *ao vivo* usando un objetivo de inmersión (100x), en el microscopio Olympus BX-51. Para cada animal, se normalizó el número de células contadas por la cantidad de secciones.

3.5.4.4 Análisis de células microgliales

Las células microgliales se identificaron como células inmunorreactivas (ir) Iba1 (Iba1-ir). Para ello, se cuantificaron tres campos del GD y del SR de CA1 correspondientes por sección. Se utilizó una grilla cuadrada de 22500 μm^2 de área superpuesta sobre imágenes calibradas tomadas con un objetivo de inmersión (60x), y se contaron las células dentro del área de la grilla. Se tomaron como límites de inclusión las líneas inferior y derecha, y como límite exterior las líneas superior e izquierda. El recuento total de células se normalizó por el número de secciones analizadas. Adicionalmente, se obtuvo el porcentaje de células Iba1 positivas reactivas y no reactivas, clasificándolas morfológicamente como tipos I, II, III, IV y V (**Fig. 13**), basándose en criterios previamente documentados (Diz-Chaves et al., 2012). Los tipos I, II y III se clasificaron como glía no reactiva, mientras que los tipos IV y V se tomaron como glía reactiva.

3.5.4.5 Análisis de células astrogliales (inmunohistoquímica)

Para el análisis de células astrogliales, se utilizaron imágenes calibradas obtenidas con objetivo de inmersión (100x). Con el fin de estimar el área ocupada por los cuerpos y procesos celulares, los astrocitos GFAP-ir se segmentaron como se describió anteriormente para el análisis de las neuronas maduras. Para cada animal, la suma de las áreas inmunorreactivas se dividió por el número de secciones.

Para estudiar la complejidad de procesos astrogliales, los astrocitos GFAP-ir se evaluaron mediante el análisis de Sholl (Sholl, 1953). El análisis de Sholl realiza el recuento del número de procesos que intersecan con los círculos concéntricos a distancias iguales (5 μm) de un diagrama que se centra en el soma de la célula (**Fig 29C**). De cada rata, se eligieron 25 astrocitos al azar. Se contaron los procesos primarios de cada célula (es decir, las prolongaciones que emergen directamente del soma) y las imágenes se convirtieron en monocromáticas de 8 bits y se analizaron mediante el *plugin* de análisis Image J Sholl, disponible en https://sites.imagej.net/Sholl_Analysis/. De esta forma, el software contabilizó el número de intersecciones de los procesos por anillo (*i*). Adicionalmente, se estimó la longitud total de los procesos mediante la suma de los valores de *i* para cada anillo multiplicado por 5 (distancia entre anillos).

Por otro lado, se realizó el recuento de las células positivas para GFAP, utilizando una grilla cuadrada de 2500 μm^2 de área superpuesta sobre las imágenes. Se tomaron como límites de inclusión la líneas inferior y derecha, y como límite exterior las líneas superior e izquierda. Para cada animal, se normalizó el número de células contadas por la cantidad de secciones.

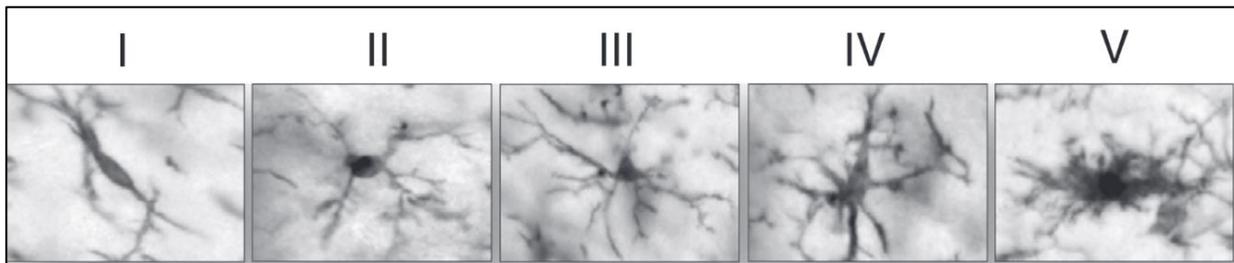


Figura 13: Clasificación morfológica de las células Iba-ir: Tipo I, células con pocos procesos celulares (dos o menos); Tipo II, células que muestran cuatro ramificaciones cortas; Tipo III, células con numerosos procesos celulares y un soma pequeño; Tipo IV, células con somas grandes y procesos retraídos y engrosados y Tipo V, células con cuerpo celular ameboide, numerosos procesos cortos e intensa inmunotinción contra Iba1. Imagen adaptada de Diz-Chaves et al., 2012.

3.5.4.6 Análisis de mosaicos de proteínas astrocitarias: GFAP, Kir 4.1 y GLT1 (inmunofluorescencia)

El nivel de expresión de GFAP (**Fig. 4b**), Kir4.1 (**Fig. 4c**) y GLT1 (**Fig 4d**) se cuantificó como intensidad de fluorescencia en imágenes en mosaico adquiridas con un objetivo de 10x. Para ello, se destinaron tres series distintas de cortes coronales para cada IF. Se utilizó la herramienta de ROI en ImageJ para dibujar tres regiones en cada imagen y en ambos hemisferios, correspondientes al GD, CA1 y CA3 (**Fig. 14A**). La señal de intensidad media en cada región se extrajo con Image J. La señal de intensidad de fondo se midió en regiones no teñidas de la misma sección y se la sustrajo a la señal total del fluoróforo de interés.

3.5.4.7 Análisis de expresión de STAT3 en los núcleos astrocíticos

Para evaluar la activación de STAT3 (es decir, su translocación al núcleo) en los astrocitos, se adquirieron imágenes con un microscopio confocal de las secciones marcadas para GFAP/STAT3/DAPI, con un objetivo de inmersión (40x), en el Hilus del GD, en el SR de CA1 y en el SL de CA3 (3 secciones cerebrales por rata, 1 campo por región, 10 planos focales en Z de 1 μm , proyecciones máximas). Debido a la gran cantidad de células en las imágenes del Hilus, se utilizó la herramienta Grid en ImageJ para superponer una grilla cuadrada de 5000 μm^2 sobre la imagen, de manera de realizar un muestreo

aleatorio al seleccionar las células ubicadas en cuadrados intercalados de la grilla. Los tres canales de las imágenes se separaron, y se utilizó la herramienta de ROI en ImageJ para dibujar regiones alrededor de los núcleos de astrocitos GFAP⁺ en el canal DAPI, y estas regiones fueron utilizadas para medir su valor medio individual de escala de gris en el canal de STAT3 (Fig 15). Se analizaron aproximadamente 60 astrocitos por rata y región.

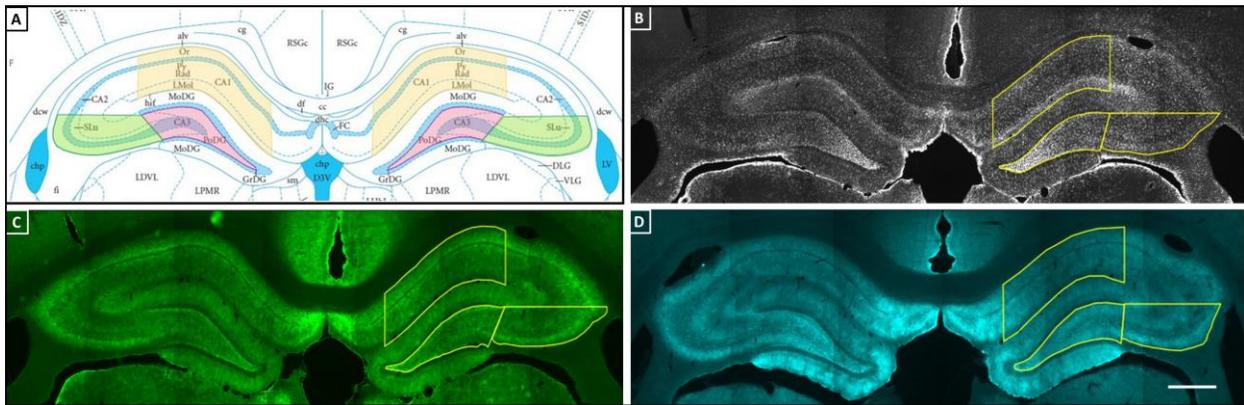


Figura 14: **Inmunofluorescencia para GFAP, Kir4.1 y GLT1 en el hipocampo dorsal.** Esquema adaptado del Atlas “The Rat Brain in stereotaxic coordinates” (Paxinos y Watson, 1998) mostrando en amarillo la región analizada de CA1, en verde la región analizada de CA3 y en rosa la región analizada del GD (A). Imágenes representativas de mosaicos de GFAP (B), Kir 4.1 (C) y GLT1 (D). Barra de escala: 500 μ m.

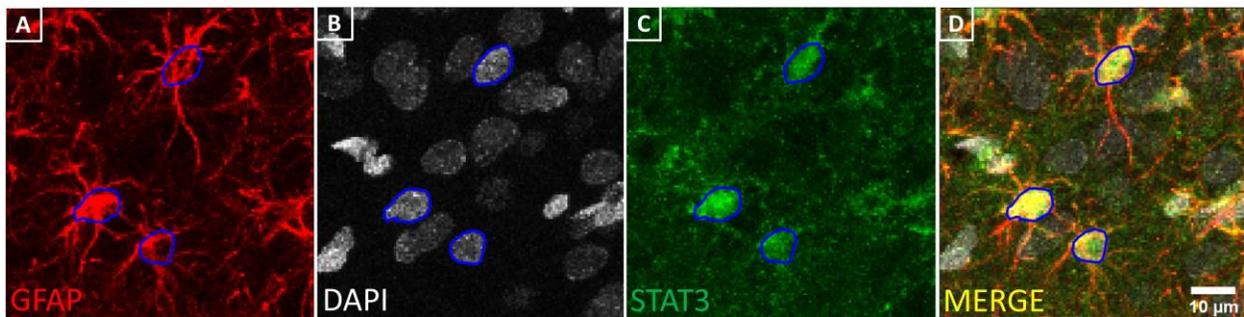


Figura 15: **Ejemplo de selección de núcleos de astrocitos.** ROIs en el canal de GFAP (A), de DAPI (B), de STAT3 (C) y superposición de canales (D). El valor medio de escala de gris de cada ROI fue medida en el canal de STAT3. Barra de escala: 10 μ m.

3.5.4.8 Análisis de colocalización sináptica

Para estudiar la integridad de la sinapsis, se evaluó la colocalización de la proteína presináptica Bassoon con la proteína postsináptica Homer. Se adquirieron imágenes con un microscopio confocal utilizando un objetivo de inmersión (63x + 3x) en el Hilus del GD, y en el SR y SL de CA3 (3 secciones de cerebro por rata, 1 campo por región, 26 planos focales en Z de 0,2 μ m). A continuación, se realizó una deconvolución de las imágenes utilizando el software AutoQuant. Las imágenes deconvolucionadas se segmentaron en ImageJ. Para ello, primero se utilizó la herramienta “Bleach correction”, con método de ajuste exponencial, para corregir el fotoblanqueo observado en el stack de imágenes. Luego se procedió a binarizar las imágenes utilizando el algoritmo Otsu. A continuación, se utilizó el plugin 3D Fast Filters

(parte del 3D ImageJ Suite) para la detección de objetos con máximos locales y el análisis 3D de la distribución de intensidad alrededor de los máximos. Con las imágenes segmentadas, se utilizó el *plugin* DiAna desarrollado por Gilles et al., 2017 para realizar un análisis espacial en 3D para la colocalización.

3.5.5 Western blot

Para obtener lisados de proteínas, los hemi-hipocampos derechos fueron homogeneizados con buffer RIPA (NaCl 150 mM, Triton X-100 1%, deoxicolato de sodio 0,5%, SDS 0,1%, Tris-HCl 50 mM pH 8, e inhibidores de proteasas y fosfatasa, pH 7,4) previamente enfriado. Luego de centrifugar a 13000 rpm durante 15 min a 4°C y recolectar el sobrenadante, la concentración de proteínas se midió mediante el ensayo de proteínas de Bradford (Coomassie Brilliant Blue G al 1% p/v, etanol al 95%, y ácido fosfórico al 85%), midiendo absorbancia a 595 nm. Se utilizó una curva estándar de BSA (concentraciones entre 0,1-1 mg/ml). Las muestras se alicuotaron y se almacenaron a -80°C hasta su uso.

Se separaron cantidades iguales de proteínas (50 µg) de cada muestra en un gel SDS-PAGE al 10%, y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Cat#1620115, Bio-Rad Laboratories). La migración de proteínas y su transferencia a la membrana se comprobó sistemáticamente utilizando rojo Ponceau. Las membranas se bloquearon en leche descremada al 5% en solución salina tamponada con Tris/Tween-20 (TBS-T) durante 1 h a temperatura ambiente y luego se incubaron durante toda la noche, en agitación constante y a 4°C con anticuerpos primarios detallados en la **Tabla 1**. A continuación, las membranas se incubaron con el correspondiente anticuerpo secundario acoplado a la enzima peroxidasa HRP durante 3 h a temperatura ambiente. Tras el lavado con TBS-T, la visualización de la membrana se realizó con el sustrato quimioluminiscente Super Signal West Pico PLUS Chemiluminescent substrate (Thermo Fisher Scientific, #34577) utilizando Chemidoc Image Station (Bio-Rad, Hercules, CA). La densidad óptica relativa de las bandas de proteínas se analizó utilizando el software ImageJ.

3.6 Diseño experimental Objetivo 1

Para caracterizar el efecto de la STZ-icv en ratas macho a corto y largo plazo, después de 25 y 95 días de su administración, respectivamente, se utilizaron los datos generados por nuestro grupo y publicados en Zappa Villar et al., 2018, 2020.

Para el experimento de STZ-icv a corto plazo, una semana antes de la inyección de STZ, se implantó icv una cánula en todos los animales. Luego, en el día experimental (DEx) 0, los animales fueron divididos aleatoriamente formando tres grupos de seis animales cada uno, Sham y STZ1 (inyectados con 1mg/kg) y STZ (inyectados con 3 mg/kg). Para este estudio se analizaron los datos de los grupos Sham y STZ (3mg/kg), ya que la dosis menor de STZ no fue seleccionada para reproducir el modelo en los experimentos subsiguientes. Se inyectó LCRa o STZ, respectivamente, como se detalla en la **sección 3.4.2**. Dos semanas post inyección de STZ, se realizaron las pruebas de memoria (LB y test RO). El último día (DEx 25) se procedió a la eutanasia de todas las ratas mediante rápida decapitación (**Fig. 16A**).

Para el experimento de STZ-icv a mediano plazo, en el DEx 0, los animales se dividieron aleatoriamente en tres grupos de siete animales cada uno: Sham, STZ y STZ+MSC. Para este estudio se analizaron los datos de los grupos Sham y STZ, los cuales fueron inyectados con LCRa o STZ, respectivamente. Luego de 86 días post inyección de STZ, se dio inicio a pruebas de comportamiento,

entre ellas el LB y el test RO. Los resultados del resto de las pruebas (CA y MB), no fueron seleccionados para este objetivo (y no se incluyen en la **figura 16B**), a efectos de realizar una comparación con los grupos del experimento a corto plazo. Finalmente, se realizó la eutanasia de los animales en el DEX 95 por decapitación rápida (**Fig 16B**).

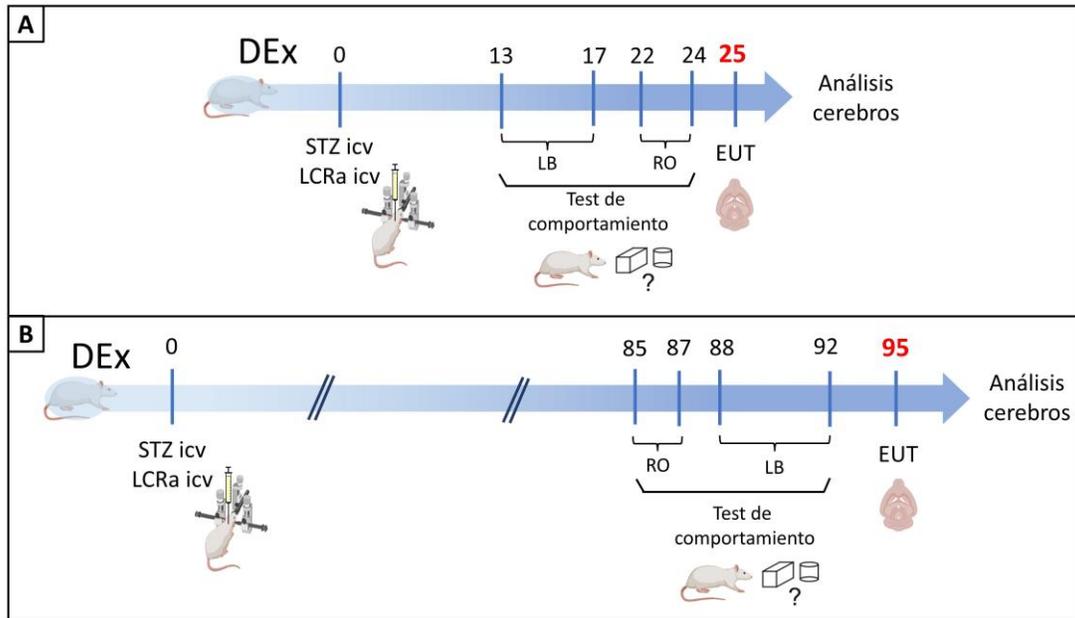


Figura 16: Diseño experimental de los experimentos a corto y a largo plazo con STZ-icv. En el DEX 0, se inyectó STZ o LCRa (icv). En el DEX 13 se realizó el test de LB (protocolo de 5 días), y del DEX 22 al 24 se llevó a cabo el RO (protocolo de 3 días); finalmente las ratas se sacrificaron en el DEX 25 (**A**). En el DEX 0, se inyectó STZ o LCRa (icv). En el DEX 85 se inició con el test RO (protocolo de 3 días) y desde el DEX 88 al 92 se realizó el test de LB (protocolo de 5 días); finalmente las ratas se sacrificaron en el DEX 95 (**B**).

3.7 Diseño experimental Objetivo 2

Para el experimento de terapia génica con IGF1 (Zappa Villar et al., 2021), en el DEX 0 la cohorte se dividió aleatoriamente en tres grupos experimentales, de siete ratas macho cada uno: Sham, STZ y STZ+IGF1. Las ratas fueron anestesiadas y sometidas a cirugía cerebral en un marco estereotáxico para la inyección icv de STZ o LCRa. Luego de seis días, el grupo STZ + IGF1 recibió icv 5×10^8 ufp del vector RAD-IGF1, mientras que el resto de los animales recibieron nuevamente LCRa. Tras la cirugía, se inyectó una dosis única de ampicilina intraperitoneal. Dos semanas post STZ-icv se inició a una batería de test comportamentales, como se detalla en la **figura 17**. En el DEX 24, se procedió a realizar la eutanasia de todas las ratas por decapitación rápida y se extrajeron rápidamente los cerebros para su posterior análisis.

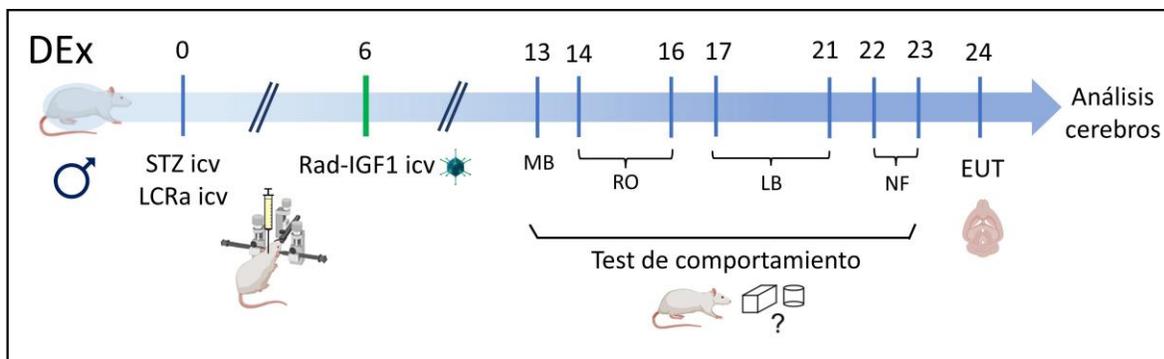


Figura 17: Diseño experimental de la terapia génica con IGF1. En el DEx 0, se inyectó STZ o LCRa (icv). En el DEx 6, el grupo STZ+IGF1 recibió icv RAD-IGF1. A partir del DEx 13 se iniciaron los test de comportamiento, comenzando por el MB. El test RO se realizó en los DEx 15 y 16. Posteriormente, desde el DEx 17 al 21, los animales fueron sometidos a la prueba del LB. Como última prueba, se llevó a cabo el test de NF en los DEx 22 y 23. Finalmente, en el DEx 24 se sacrificaron las ratas (EUT) y se extrajeron los cerebros para su análisis.

3.8 Diseño experimental Objetivo 3

Para el experimento de terapia génica con timulina, la cohorte se dividió aleatoriamente en tres grupos experimentales, de ocho ratas macho cada uno: Sham, STZ, y STZ+FTS. En el DEX 0, las ratas fueron anestesiadas y sometidas a cirugía cerebral en un marco estereotáxico para la inyección icv de STZ o LCRa. Durante el experimento, el grupo STZ+FTS recibió dos inyecciones im, en los DEX 5 y 45 del vector RAD-metFTS. Luego de 79 días post STZ-icv, se inició una batería de test comportamentales como se detalla en **figura 18**. Finalmente, se procedió a la eutanasia de todas las ratas 3 meses después de la inyección STZ por decapitación rápida. Se extrajeron rápidamente los cerebros para su posterior análisis.

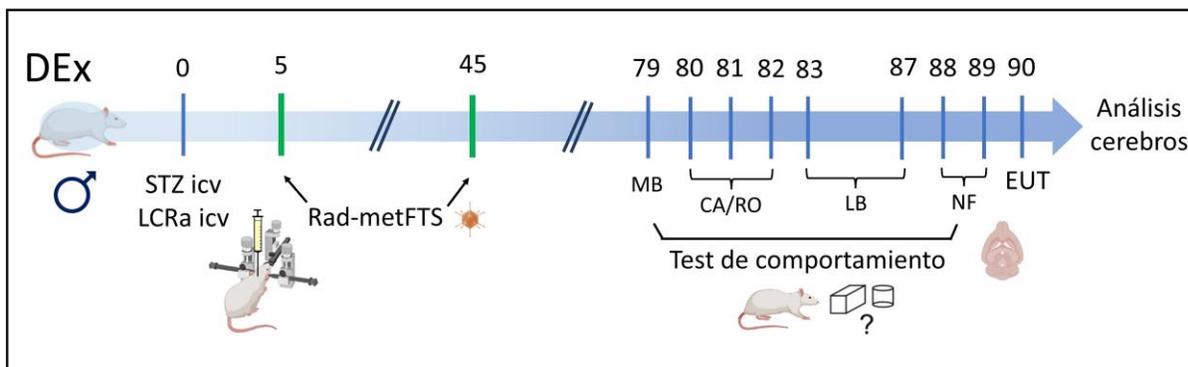


Figura 18: Diseño experimental de la terapia génica con timulina. En el DEx 0, se inyectó STZ o LCRa (icv). En los DEx 5 y 45, el grupo STZ + FTS recibió una inyección intramuscular del vector RAD-metFTS. En el DEx 79 se realizó la prueba MB. El CA y el RO se realizaron en los DEx 80 a 82. Posteriormente, en los DEx 83 a 87, los animales fueron sometidos a la prueba del LB. Como última prueba, se llevó a cabo el test NF en los DEx 88 y 89. Por último, en el DEx 90 se sacrificaron las ratas (EUT) y se extrajeron los cerebros para su análisis.

3.9 Diseño experimental Objetivo 4

Ratas macho de 3 meses de edad se dividieron aleatoriamente en tres grupos experimentales, de siete ratas macho cada uno: Sham, STZ, STZ+Sc, STZ+Sc(IGF1). En el DEX 0 las ratas fueron anestesiadas y sometidas a cirugía cerebral en un marco estereotáxico para la inyección icv de STZ o LCRa. Diechocho días después de la cirugía se iniciaron las instilaciones intranasales, que fueron realizadas cada un

intervalo de 4 o 5 días, durante dos meses (hasta el DEx 77). Tres días después de la última instilación intranasal, se realizaron a varias pruebas de comportamiento, como se detalla en la **figura 19**. Finalmente, se realizó la eutanasia de todas las ratas 3 meses después de la inyección de STZ por decapitación rápida.

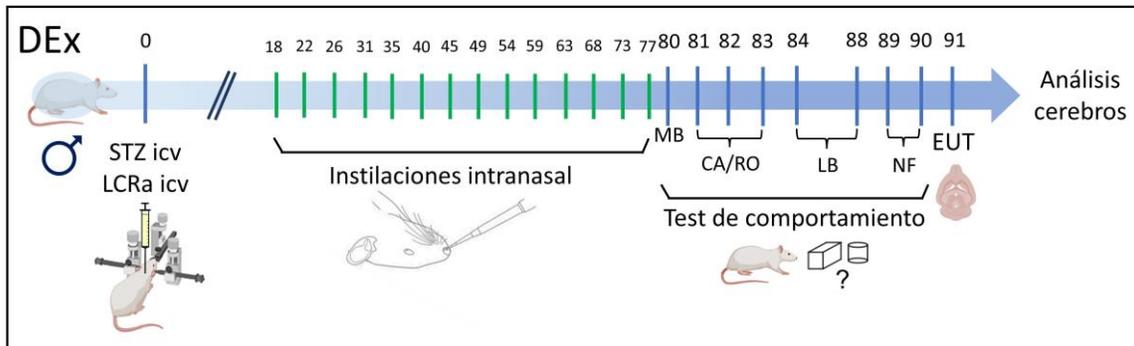


Figura 19: Diseño experimental de la terapia celular con Sc de MSC. En el DEx 0, se inyectó STZ o LCRa (icv). Desde el DEx 18 al 77, los animales fueron anestesiados con isoflurano durante catorce oportunidades diferentes, para realizar las instilaciones intranasales de Sc de MSC. A partir del DEx 80 se iniciaron los test de comportamiento, comenzando con el MB. En el DEx 81 se realizó el test de CA, y en los dos días siguientes el test RO. La prueba de LB se realizó desde el DEx 84 hasta el 88 y finalmente se realizó el test NF en los DEx 89 y 90. Por último, la eutanasia de los animales se llevó a cabo el DEx 91, luego de la cual se extrajeron los cerebros para su posterior análisis

3.10 Diseño experimental Objetivo 5

Se utilizaron ratas hembra de 2,5 meses de edad. Dos semanas antes de la cirugía estereotáxica, la mitad de las ratas fueron ovariectomizadas (OVX), mientras que el resto mantuvo sus ovarios intactos (Sham). En el DEx 0, al cumplir los 3 meses de edad, las ratas fueron anestesiadas y sometidas a inyección icv para la administración de STZ o de LCRa, de manera que se dividieron en cuatro grupos experimentales, de ocho animales cada uno: Sham+LCRa, Sham+STZ, OVX+LCRa y OVX+STZ. Los grupos Sham+STZ y OVX+STZ recibieron STZ-icv a una dosis de 3 mg/kg, al igual que en experimentos previos con machos. Los grupos Sham+LCRa y OVX+LCRa recibieron 5 μ l de LCRa. Durante las dos últimas semanas hasta el final del estudio, se realizó una batería de test comportamentales, como se indica en la **figura 20**. Finalmente, treinta días post STZ-icv se realizó la eutanasia de todas las ratas por decapitación rápida.

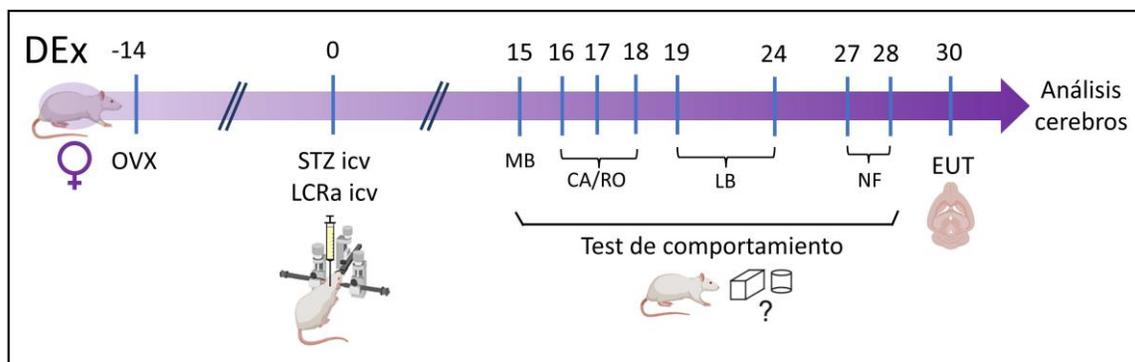


Figura 20: Diseño experimental de la evaluación del efecto de STZ-icv en ratas hembra. En el DEx -14, la mitad de las ratas fueron ovariectomizadas, mientras que el resto fueron dejadas con sus ovarios intactos. Dos semanas después (DEx 0), se inyectó STZ-icv a la mitad de las ratas OVX y a la mitad de las ratas Sham, mientras que el resto de los animales recibió LCRa. En el DEx 15 se

inició con la batería de test comportamentales organizados en el siguiente orden: MB, CA, RO, LB, y NF. Luego de treinta días post STZ-icv se realizó la eutanasia (EUT) de los animales y extracción de cerebros para su posterior análisis.

3.11 Diseño experimental Objetivo 6

Se utilizaron ratas macho y hembras de la misma edad. Dos semanas previas a la inyección de STZ-icv, la mitad de las ratas hembra fueron ovariectomizadas (llamadas OVX) mientras que el resto fueron dejadas con sus ovarios intactos (llamadas hembras). Luego de 14 días, en el DEx 0, cuando todas las ratas cumplieron 3 meses de edad, los animales se dividieron en los siguientes grupos experimentales: i) machos+LCRa, ii) machos+STZ, iii) hembras+LCRa, iv) hembras+STZ; v) OVX+LCRa, vi) OVX+STZ. De esta manera, la mitad de los machos, de las hembras y de las ratas OVX recibieron STZ-icv, mientras que la otra mitad LCRa. Dos semanas luego de la cirugía estereotáxica, se realizó una serie de test comportamentales como se indica en la **figura 21**. Finalmente, en el DEx 25 se realizó la eutanasia de todas las ratas por perfusión intracardíaca.

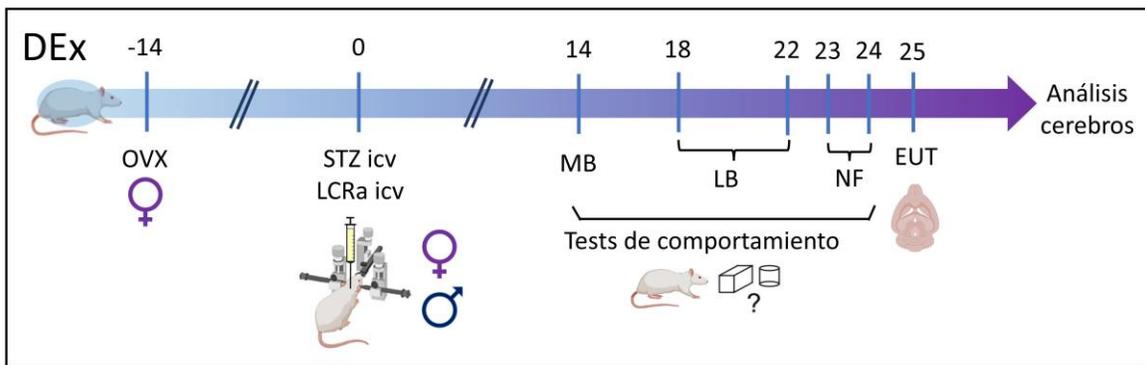


Figura 28: Diseño experimental de la comparación del modelo STZ-icv entre machos y hembras. En el DEx -14, la mitad de las ratas fueron ovariectomizadas (OVX), el resto dejadas con sus ovarios intactos (Hembras) y los machos dejados sin intervenir. Dos semanas después (DEx 0), todas las ratas de ambos sexos se inyectaron STZ o LCRa. En el DEx 14 se inició con los tests comportamentales organizados en el siguiente orden: MB, LB, y NF. Luego de veinticinco días post STZ-icv se realizó la eutanasia (EUT) de los animales y extracción de cerebros para su posterior análisis.

3.12 Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como media \pm SEM. Los análisis estadísticos se realizaron con el programa GraphPad Prism 9.4.1 (San Diego, CA, EE.UU.) e Infostat (versión 2020, Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina). De manera general, en primer lugar, se corroboró el cumplimiento de los supuestos necesarios para realizar las diferentes pruebas estadísticas. Para ello, se evaluó la normalidad de los residuos y la homocedasticidad, gráficamente (mediante gráficos Q-Q plot y gráficos de densidad de puntos de los residuos estudiantizados vs. los valores predichos), y mediante las pruebas de Shapiro-Wilk modificado y Levene, respectivamente. Cuando los datos no cumplieron los supuestos, se aplicó una transformación logarítmica (en el caso de las canicas enterradas en el test de MB), o de raíz cuadrada (en el recuento de neuronas PSA-NCAM-ir), para lograr la normalidad y homocedasticidad de los datos. Se estableció un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$ y se consideró

significativo un valor de $p < 0,05$. Cuando el análisis de la varianza (ANOVA) fue significativo, se realizó la prueba post hoc de Tuckey para identificar diferencias entre los grupos experimentales.

Particularmente, para el objetivo 1, se utilizó el test t de Student para comparar las medias de los grupos Sham y STZ en los distintos parámetros comportamentales y en la expresión de las proteínas evaluadas mediante WB. Para los resultados del test RO, se realizó un t-test pareado ya que se comparó la exploración de los objetos familiar y novedosos para el mismo grupo. Para analizar el peso corporal, se realizó un ANOVA de dos factores con medidas repetidas, teniendo en cuenta el factor STZ y el factor tiempo (en días). También se realizó ANOVA de dos factores con el fin de examinar el efecto de la STZ y del tiempo post STZ, sobre el IRA de GFAP, la longitud de los procesos y el número de procesos primarios de los astrocitos, el recuento de células GFAP e Iba1-ir, el porcentaje de células Iba1 reactivas, y el volumen del SR de CA1. Para dicho análisis, las comparaciones entre los grupos Sham 25días y STZ 95días, y Sham 95días y STZ 25 días, no fueron tenidas en cuenta ya que no aportan información relevante para el análisis acorde al objetivo del estudio. El análisis de Sholl de los astrocitos fue analizado mediante un ANOVA de tres factores con medidas repetidas para evaluar el efecto de la STZ, del tiempo post STZ y de la distancia al soma sobre el número de intersecciones de los procesos, una medida de arborización celular.

Para los objetivos 2, 3 y 4, los resultados fueron analizado mediante ANOVA de un factor, excepto para el análisis de Sholl realizado en el objetivo 3, para el cual se utilizó un ANOVA de dos factores con medidas repetidas, con el fin de evaluar el efecto del tratamiento y de la distancia al soma. Adicionalmente, para el objetivo 2 se realizó un análisis de correlación de Pearson, graficando los resultados en una matriz que opone las variables de comportamiento a parámetros relacionados a neuronas: neuronas maduras e inmaduras, y niveles de expresión de pTau/Tau y proteínas sinápticas.

Para el objetivo 5, se realizó un ANOVA de tres factores con medidas repetidas para examinar el efecto de la OVX, la STZ y del tiempo sobre el peso corporal, seguido de la prueba post hoc de Tukey. La ganancia de peso corporal 8 días después de la inyección de STZ se analizó mediante un ANOVA de dos factores para evaluar el efecto de OVX y STZ en la recuperación de peso. Para las pruebas RO, se examinaron los estadísticos de columna (prueba t de una muestra) comparando el I.D. con el nivel de azar (0). Se utilizó ANOVA de dos vías seguido de la prueba post hoc de Tukey para analizar el efecto de los tratamientos OVX y STZ sobre las restantes variables conductuales y estereológicas. Las comparaciones entre los grupos Sham+STZ y OVX+LCRa no fueron tenidas en cuenta ya que no aportan información relevante para el análisis acorde al objetivo del estudio.

Para el objetivo 6, todos los datos fueron analizados mediante ANOVA de dos factores, considerando el tratamiento de STZ como un factor, y el sexo (machos, hembras y hembras ovariectomizadas) como otro factor. Del test de comparaciones múltiples se obtuvieron 15 comparaciones, no todas relevantes para el análisis y la interpretación de los resultados según los objetivos planteados. Las comparaciones que fueron tenidas en cuenta ya que aportan información relevante para la interpretación de los resultados son:

Machos+LCRa y Machos+STZ; Machos+LCRa y Hembras+LCRa; Machos+STZ y Hembras+STZ; Machos+LCRa y OVX+STZ; Hembras+LCR y Hembras+STZ; Hembras+LCR y OVX+LCRa; Hembras+LCR y OVX+STZ; OVX+LCR y OVX+STZ

4 Capítulo IV: Caracterización del modelo de STZ-icv en ratas macho a 25 y 95 días post inyección

4.1 Objetivo

Caracterizar el modelo de EAe generado mediante inyección de STZ-icv en ratas macho, a los 25 y 95 días post inyección de STZ (modelo de corto y mediano plazo, respectivamente). Evaluar: memoria, y expresión de proteínas marcadoras de EA, microglía reactiva, astrocitos reactivos, y morfometría, en el hipocampo.

4.2 Resultados

4.2.1 Descenso en el peso corporal por inyección de STZ-icv

Se realizaron dos experimentos independientes, en el cual se evaluó el efecto de la STZ-icv hasta los 25 días y 95 días posterior a su inyección (experimento de corto y mediano plazo, respectivamente). Periódicamente, los animales fueron pesados hasta el día de la eutanasia. En ambos casos, la inyección de STZ provocó un descenso del peso corporal de los animales hasta aproximadamente una semana post inyección, tiempo después del cual comenzaron a ganar peso (**Fig. 22**). En el experimento de 25 días, la diferencia entre los grupos STZ y Sham fue significativa entre los días 5 y 15 post inyección, dejando de serlo hacia el final del experimento (**Fig. 22A**) (ANOVA de dos factores con medidas repetidas; factor STZ: $F_{(1, 10)} = 11,51$, $p = 0,0069$; factor tiempo: $F_{(11, 110)} = 79,99$, $p < 0,0001$; interacción: $F_{(11, 110)} = 10,44$, $p < 0,0001$). Para el experimento de 95 días, si bien la diferencia de peso corporal entre ambos grupos no fue significativa, se observó una marcada disminución en este parámetro post STZ-icv (**Fig. 22B**). En ambos casos, la pérdida de peso no fue causada por la intervención quirúrgica *per se*, ya que los animales del grupo control que fueron anestesiados e inyectados con LCRA, mostraron un aumento de su peso después de la estereotaxia.

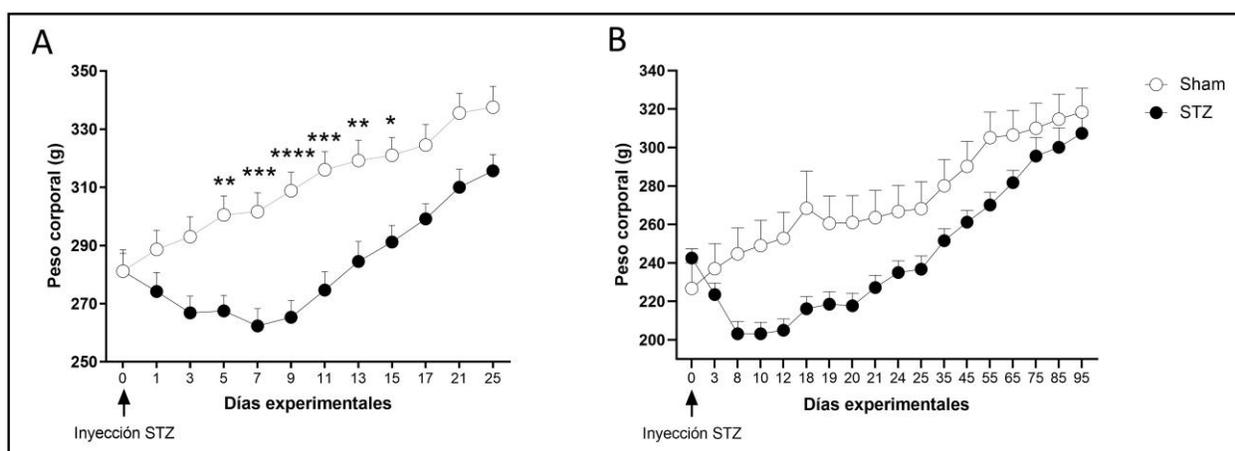


Figura 22: Descenso temporal del peso corporal post STZ-icv. El peso corporal de todas las ratas se registró a lo largo del experimento de corto plazo (25 días post STZ) (**A**), y de mediano plazo (95 días post STZ) (**B**), y en ambos casos la STZ provocó pérdida de masa corporal con posterior recuperación. Los datos se analizaron mediante ANOVA de dos factores con medidas repetidas y se expresaron como media \pm SEM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

4.2.2 Alteraciones de memoria en el modelo de STZ-icv

4.2.2.1 Deterioro en la memoria espacial

Para evaluar el efecto de la STZ-icv sobre la memoria espacial, clave para modelos de EA, se realizó el LB. En el experimento de corto plazo, los animales tratados con STZ mostraron deterioro de la memoria espacial evidenciado por un incremento en el tiempo para encontrar el agujero meta (**Fig. 23A**) (t-test de Student $p=0,0442$) y en los errores cometidos con respecto al control (**Fig. 23B**) (t-test de Student $p=0,0211$). Además, el grupo STZ exploró menos el GS de la plataforma (**Fig. 23C**) (t-test de Student $p=0,0186$), y el agujero conectado a la caja de escape (agujero 0) (**Fig. 23D**) (t-test de Student $p=0,0300$). En el experimento de 95 días, si bien se observan las tendencias esperadas, el grupo STZ no tuvo diferencias significativas respecto al Sham en la latencia (**Fig. 23E**) ni en las exploraciones del GS, aunque en este último parámetro se obtuvo un p-valor marginal (0,0549) (**Fig. 23G**). Sin embargo, la inyección de STZ produjo un aumento significativo de los errores cometidos (**Fig. 23F**) (t-test de Student $p=0,0115$), y menor exploración del agujero 0 (**Fig. 23H**) (t-test de Student $p=0,0261$). Estos resultados demuestran que la memoria espacial está afectada en este modelo de EAE ya sea evaluada a corto o mediano plazo.

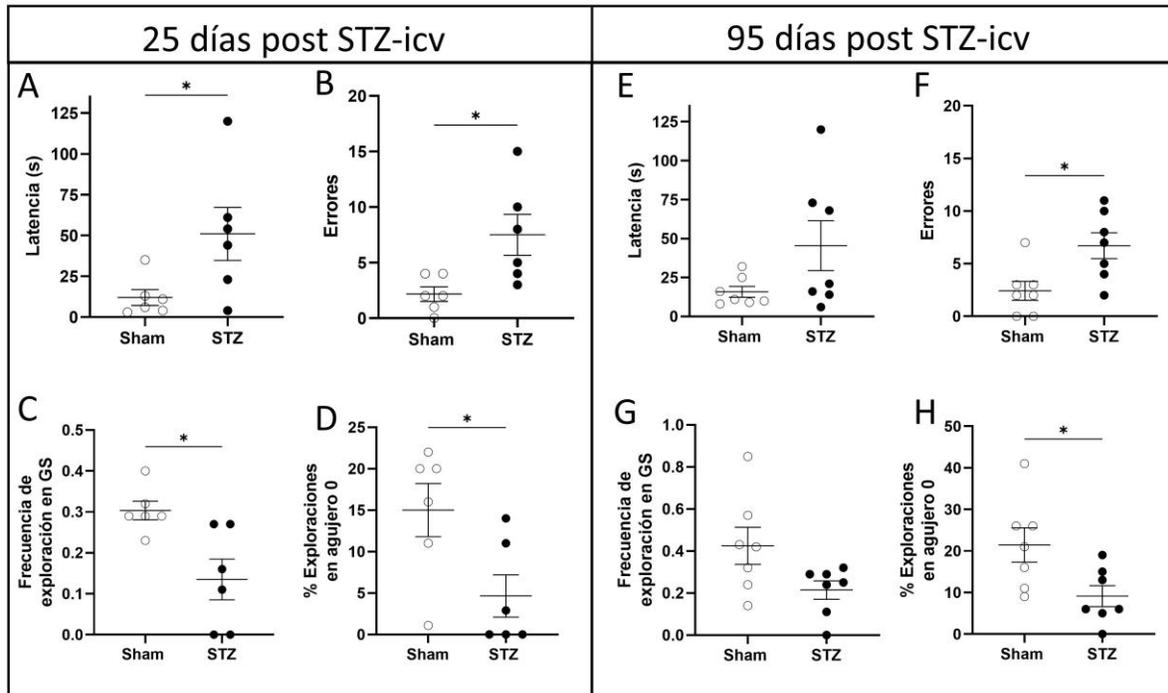


Figura 23: **Deterioro de la memoria espacial en el modelo de STZ-icv.** Gráficos A-D corresponden al experimento de corto plazo (25 días post STZ), mientras que gráficos E-H corresponden al experimento de mediano plazo (95 días post STZ). Los parámetros mostrados corresponden a cuantificaciones realizadas el último día del test de LB, en la prueba de memoria (PT), y muestran que la STZ afecta a la performance de los animales durante el test. Los datos se analizaron con t-test de Student y se expresaron como media \pm SEM. * $p < 0,05$.

Para comparar los resultados de ambos experimentos y evaluar si la STZ impacta de forma diferente en el comportamiento de los animales según el tiempo de evaluación, es decir el tiempo post STZ, se analizaron los datos de los cuatro grupos experimentales mediante un ANOVA de dos factores: tratamiento

(factor STZ) y tiempo. De esta forma encontramos que en la latencia al agujero meta, no hubo diferencias significativas entre los grupos control ni entre los grupos STZ (**Fig. 24A**). Lo mismo fue observado para los errores cometidos, aunque en este parámetro la diferencia entre Sham y STZ reportada anteriormente para el experimento de 25 días, se mantuvo significativa (no así la diferencia de 95 días) (**Fig. 24B**) (ANOVA de dos factores; factor STZ: $F_{(1, 22)}=15,55$, $p=0,0007$; factor tiempo: $F_{(1, 22)}=0,0461$, $p=0,8329$; interacción: $F_{(1, 22)}=0,1844$, $p=0,6718$). Las diferencias encontradas para las exploraciones del GS y del agujero meta terminaron volviéndose no significativas al analizar los cuatro grupos juntos (**Fig. 24C, D**), aunque en ambos casos el factor STZ fue significativo, con una interacción no significativa (p -valor > 0,05) (ANOVA de dos factores; factor STZ [frecuencia GS]: $F_{(1, 22)}=10,19$, $p=0,0042$; factor STZ [%exploraciones agujero 0]: $F_{(1, 22)}=12,24$, $p=0,002$).

En conclusión, si bien la STZ-icv afectó la memoria espacial en ambos experimentos (**Fig. 23**), la comparación de ambos tiempos sugiere que el efecto de la droga es más marcado a corto plazo en vez de mediano plazo post inyección icv.

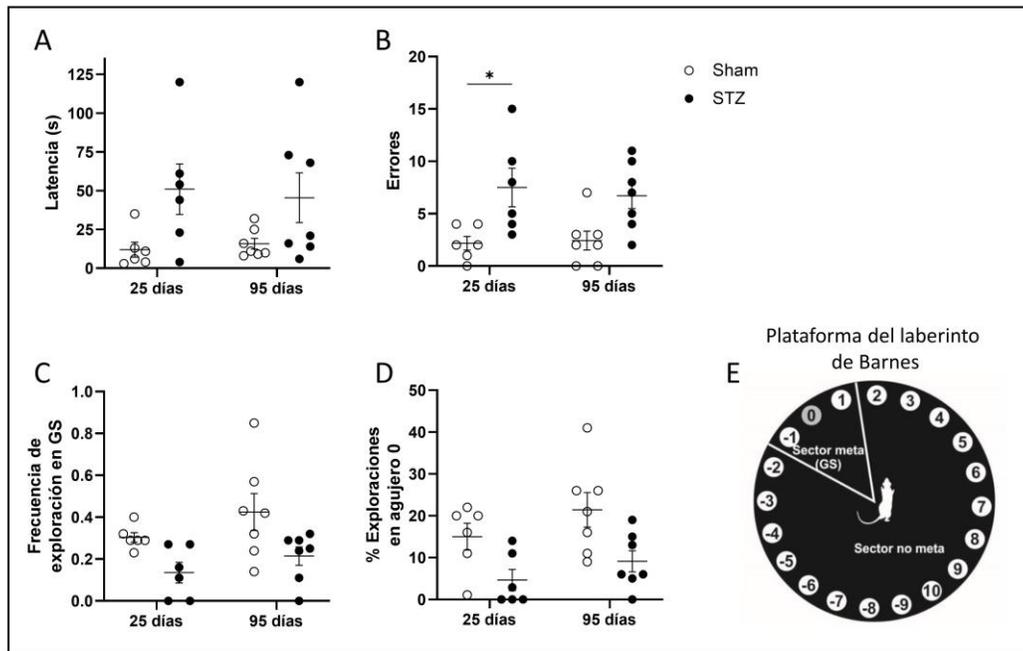


Figura 24: Comparación de los resultados de memoria espacial entre 25 y 95 días post STZ. Las diferencias significativas encontradas al analizar los experimentos individualmente se perdieron al evaluar el desempeño de los cuatro grupos experimentales en la latencia a encontrar el agujero 0 (A), la frecuencia de exploración del GS (C), y porcentaje de exploración del agujero 0 (D). Sin embargo, a 25 días post STZ, las ratas inyectadas cometieron significativamente más errores que su grupo control (B). El esquema muestra la plataforma usada durante el test, con el sector meta (GS) comprendido por los agujeros -1, 0 y 1. Los datos se analizaron mediante ANOVA de dos factores y se expresaron como media ± SEM. * $p < 0,05$

4.2.2.2 Deterioro en la memoria de reconocimiento de objeto

La memoria de reconocimiento de objeto fue evaluada mediante el test RO. Como se observa en la **figura 25A y B**, en ambos experimentos, los animales del grupo control mostraron recordar el objeto familiar, que conocieron durante la fase de entrenamiento, dado que prefirieron explorar durante más tiempo el objeto nuevo. Sin embargo, la STZ-icv perjudicó este tipo de memoria, ya que las ratas de ambos

grupos inyectados con la droga no mostraron preferencia por el objeto nuevo (**Fig. A**, t-test pareado: grupo Sham: $p=0,0437$; grupo STZ: $p=0,8116$. **Fig. B**, t-test pareado: grupo Sham: $p=0,0218$; grupo STZ: $p=0,1041$).

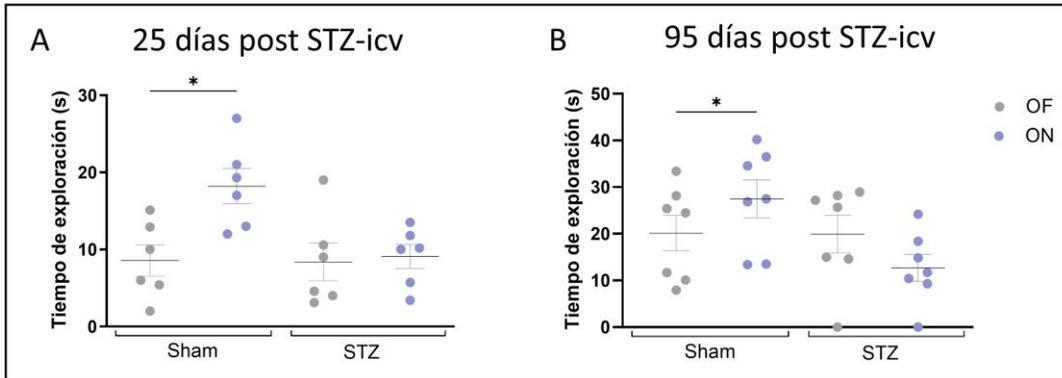


Figura 25: La STZ-icv afecta la memoria de reconocimiento de objeto. A ambos tiempos experimentales, Los animales control mostraron preferencia de exploración por el ON en lugar del OF, mientras que animales STZ no mostraron preferencia por objeto, signo de memoria deteriorada. Las comparaciones se realizaron dentro de un mismo grupo con t-test pareado, en la fase de reconocimiento del RO. OF: Objeto familiar, ON: objeto nuevo. Los datos se expresaron como media \pm SEM. * $p < 0,05$.

4.2.3 Expresión de pTau y péptido β A en el modelo de STZ-icv

Para evaluar si la STZ-icv induce un aumento de la expresión de proteínas involucradas en la patogénesis de la EA, realizamos WB de lisado hipocampal. Luego de 25 días de su inyección, la STZ provocó un aumento significativo en la fosforilación de la proteína Tau (en Ser 396) (**Fig. 26A**) (t-test de Student: $p=0,0446$), y también un aumento de expresión del péptido β A, respecto al control (**Fig. 26B**) (t-test de Student: $p=0,0015$). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en los niveles de expresión de estas dos proteínas a 95 días post STZ (**Fig. 26C y D**). No se compararon los resultados entre ambos experimentos ya que se usó un control de carga diferente.

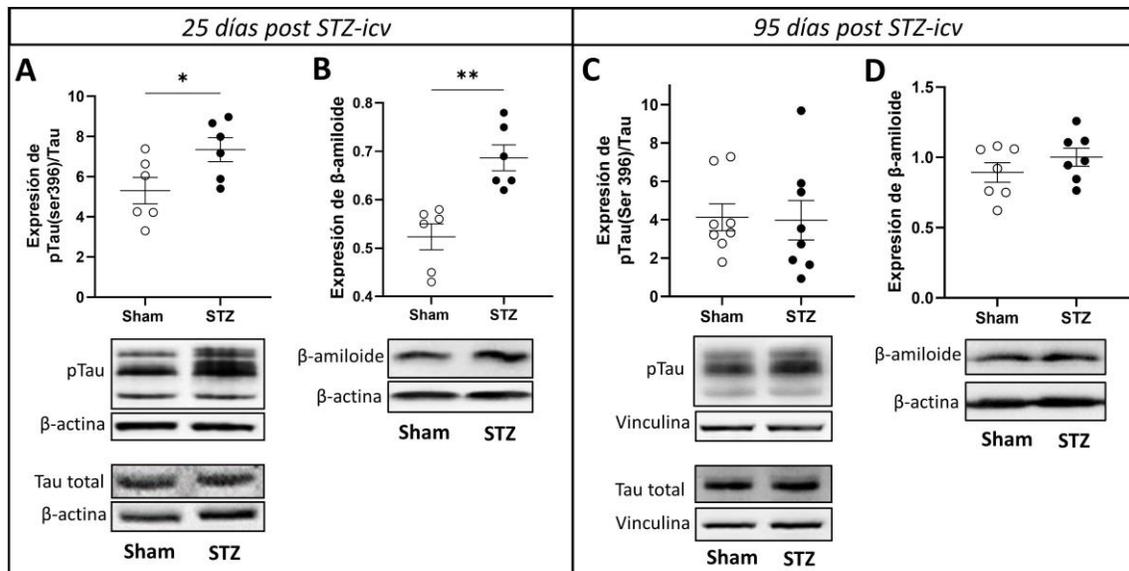


Figura 26: La STZ-icv aumenta la fosforilación de Tau y la expresión del péptido β A, a corto pero no a mediano plazo. Las proteínas del hipocampo se detectaron mediante WB y se normalizaron con β -actina. La inyección de STZ aumentó la expresión de pTau (normalizado respecto a proteína tau total) (A), y del péptido β A (B), a 25 días post inyección. No se evidenciaron cambios

en la expresión de pTau ni del péptido β A a 95 días post inyección (**C** y **D**, respectivamente). Los datos se analizaron con t-test de Student y se expresaron como media \pm SEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

4.2.4 Incremento de la glía reactiva en el modelo de STZ-icv

4.2.4.1 Microglía reactiva

En el SR de CA1 del hipocampo, la inyección de STZ-icv indujo un aumento del número de células microgliales identificadas como células Iba1-ir, tanto a 25 días (**Fig. 27A**) (t-test de Student, $p=0,0015$), como a 95 días post STZ (**Fig. 27E**) (t-test de Student, $p=0,0001$). Al evaluar la morfología de estas células, encontramos que la STZ provocó cambios en su estructura, observándose células con morfología ameboide, y acortamiento y engrosamiento de sus procesos respecto a las células del grupo control, como se aprecia en las microfotografías de la **figura 27 (D, H)**. Estos cambios morfológicos son indicativos de un incremento en la reactividad de la microglía, el cual fue significativo a 25 días (**Fig. 27B**) (t-test de Student, $p=0,0273$), y 95 días post STZ (**Fig. 27F**) (t-test de Student, $p < 0,0001$). Por lo tanto, los datos demuestran que la población microglial es susceptible a la STZ, ya que estas células responden aumentando su número y volviéndose reactivas, permaneciendo así incluso 3 meses después de la inyección.

Cuando se realizaron las comparaciones entre los cuatro grupos experimentales para evaluar posibles diferencias entre los grupos STZ, encontramos que el número de células Iba1-ir no se vio afectado por la diferencia de edad entre los controles, pero si por el tiempo post-STZ, ya que estuvo significativamente incrementada a 25 días respecto de 95 días post STZ (**Fig. 27I**) (ANOVA de dos factores, factor STZ: $F_{(1, 22)} = 36,15$, $p < 0,0001$, factor tiempo: $F_{(1, 22)} = 5,309$, $p = 0,0310$, interacción: $F_{(1, 22)} = 9,039$, $p = 0,0065$).

Con respecto a la proporción de células reactivas, en primer lugar, observamos diferencias significativas entre los grupos Sham, con menor proporción de microglía reactiva a los 95 días (**Fig. 27J**). A pesar de esta diferencia, la STZ promovió igualmente un aumento significativo del porcentaje de células reactivas a ambos tiempos, que fue comparable entre ambos grupos tratados (**Fig. 27J**) (ANOVA de dos factores, factor STZ: $F_{(1, 22)} = 37,50$, $p < 0,0001$, factor tiempo: $F_{(1, 22)} = 15,11$, $p = 0,0008$, interacción: $F_{(1, 22)} = 3,477$, $p = 0,0756$). Si bien no se realizó un experimento para evaluar proliferación celular, estos resultados sugieren que después de un daño agudo con STZ (25 días) la microglía prolifera más que a tiempos más prologados post injuria. A pesar de esta diferencia, la microglía evaluada a 25 o 95 días post STZ, se encuentra igual de reactiva.

4.2.4.2 Astrocitos reactivos

Para evaluar si las células astrogiales respondían a la STZ, se cuantificó el número de células GFAP-ir y el IRA ocupada por GFAP en el SR de CA1 del hipocampo. Tanto a corto como a mediano plazo, ambos grupos experimentales mostraron valores similares respecto al número de astrocitos (**Fig. 28A y E**). En cuanto al IRA, en ambos casos la STZ produjo un aumento significativo (**Fig. 28B y F**) (t-test de Student, $p[25 \text{ días}] = 0,0255$; $p[95 \text{ días}] = 0,0020$). Estos resultados muestran que, a diferencia de la microglía, los astrocitos no responden a la STZ incrementando su número en CA1, pero si son susceptibles a la droga al aumentar la expresión de GFAP, lo que sugiere un aumento de la reactividad astrocitaria.

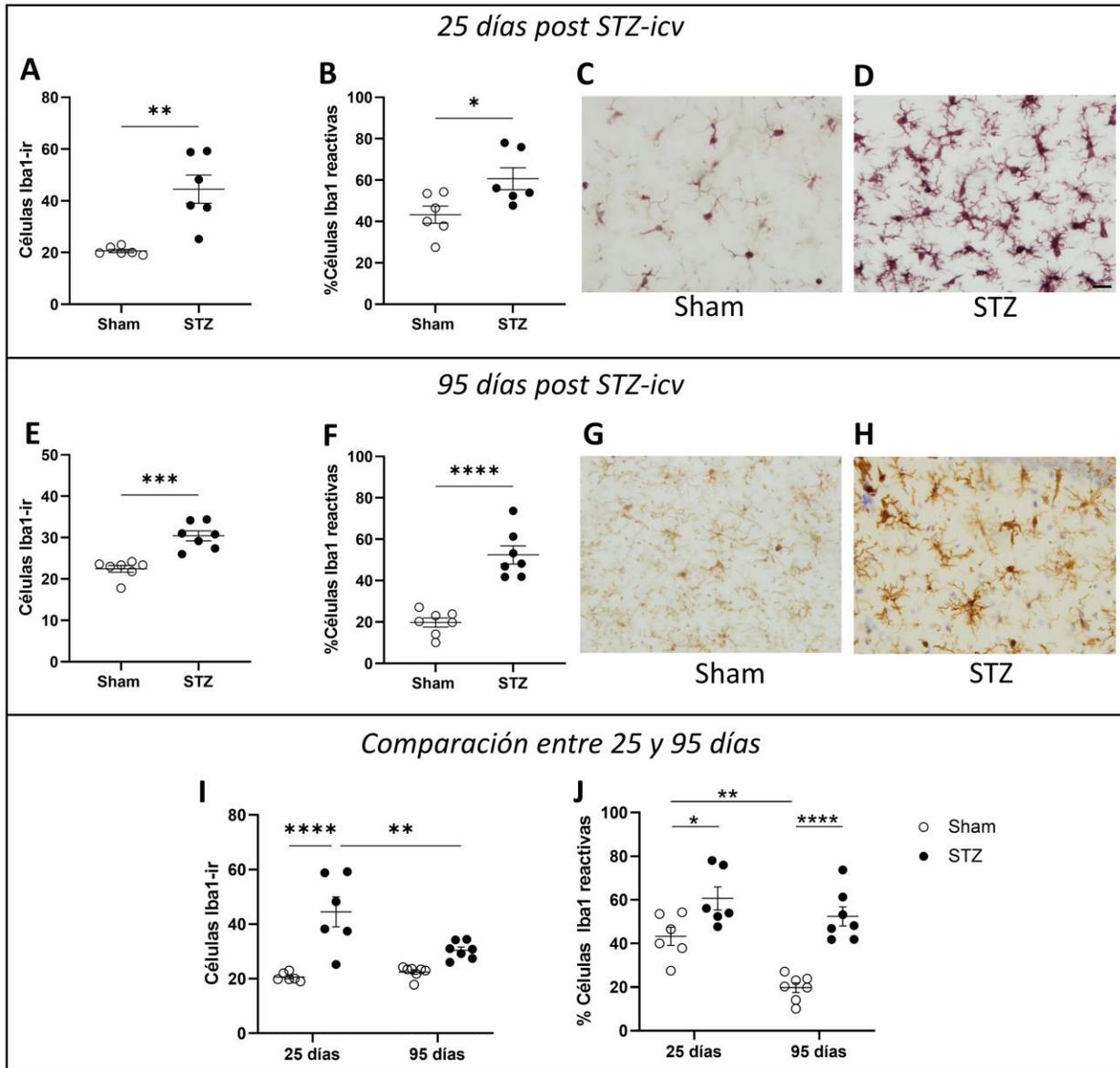


Figura 27: **Reacción de la microglía frente a la inyección de STZ-icv y comparación entre 25 y 95 días post STZ.** Se cuantificó el número de células microgliales Iba1 inmunoreactivas (ir) y el porcentaje de células reactivas a 25 días (A y B, respectivamente) y 95 días (E y F, respectivamente). Secciones coronales del SR de CA1 en animales representativos de cada grupo: Sham (C y G) y STZ (D y H), mostrando células Iba1-ir; barra de escala: 20 μ m. Los datos se analizaron mediante t-test (A, B, E, F) o ANOVA de dos factores (I, J), y se expresaron como media \pm SEM. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,0001

Al comparar entre los cuatro grupos experimentales, no se observaron diferencias entre los grupos en número de células GFAP-ir (Fig. 28I). En cuanto al IRA de GFAP, tampoco se observaron diferencias significativas entre los grupos controles, aunque el grupo STZ de 25 días presentó un aumento significativo del IRA comparado con su control Sham y con el grupo STZ a 95 días (Fig. 28J) (ANOVA de dos factores, factor STZ: $F_{(1, 22)} = 11,77$, $p = 0,0024$, factor tiempo: $F_{(1, 22)} = 7,926$, $p = 0,0101$, interacción: $F_{(1, 22)} = 5,456$, $p = 0,029$).

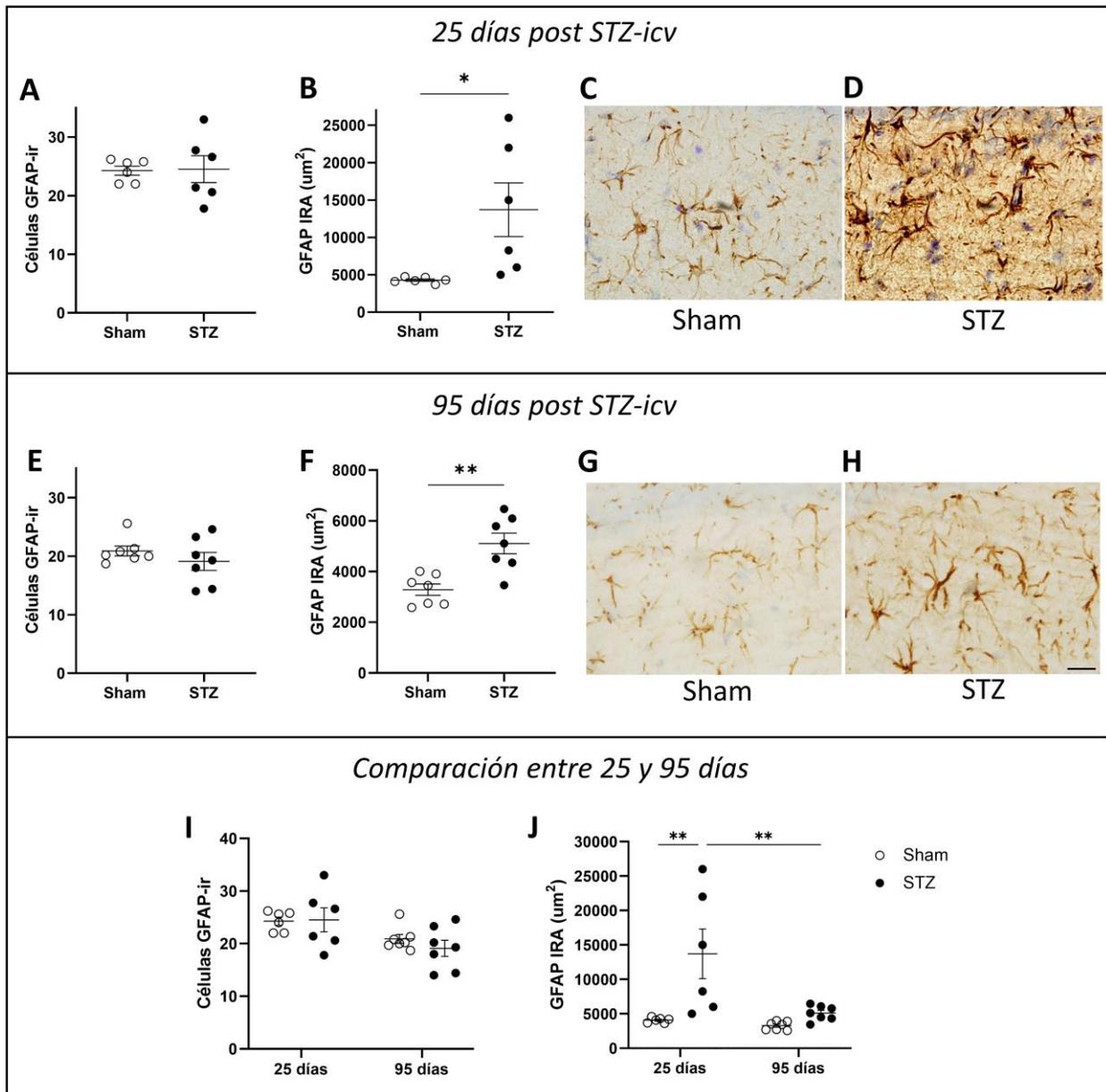


Figura 28: Reacción de los astrocitos frente a la inyección de STZ-icv y comparación entre 25 y 95 días post STZ. Se cuantificó el número de células astrogliales positivas para GFAP y el IRA de GFAP a 25 días (**A** y **B**, respectivamente) y 95 días (**E** y **F**, respectivamente). Secciones coronales del SR de CA1 en animales representativos de cada grupo: Sham (**C** y **G**) y STZ (**D** y **H**), mostrando células GFAP inmunoreactivas (ir); barra de escala: 20 μ m. Los datos se analizaron mediante t-test (**A**, **B**, **E**, **F**) o ANOVA de dos factores (**I**, **J**), y se expresaron como media \pm SEM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Por otro lado, se evaluó la morfología de los astrocitos mediante el análisis de Sholl. Nuestros resultados indican que la STZ generó una disminución de la complejidad de arborización de estas células en el corto plazo, ya que el grupo STZ a 25 días difirió significativamente de su control Sham en el número de intersecciones de procesos cerca del soma (a 10 y 15 μ m del centro) (**Fig. 29A**) (ANOVA de tres factores con medidas repetidas: factor STZ: $F_{(1, 22)}=3,270$, $p=0,0842$; factor tiempo: $F_{(1, 22)}= 40,82$, $p<0.0001$; factor distancia al soma $F_{(2,587, 56,90)}=973,0$, $p<0.0001$). En concordancia con este resultado, la STZ a 25 días

también generó una disminución en la longitud de las prolongaciones (**Fig. 29B**) (ANOVA de dos factores, factor STZ: $F_{(1, 22)} = 1,280$, $p=0,2701$, factor tiempo: $F_{(1, 22)} = 4,684$, $p=0,0416$, interacción: $F_{(1, 22)} = 10,76$, $p=0,0034$), y en el número de prolongaciones primarias (**Fig. 29C**) (ANOVA de dos factores, factor STZ: $F_{(1, 22)} = 7,220$, $p=0,0135$, factor tiempo: $F_{(1, 22)} = 8,901$, $p=0,0069$, interacción: $F_{(1, 22)} = 3,370$, $p=0,0800$).

No se encontraron diferencias entre los grupos Sham y STZ a 95 días, por lo que nuestros resultados sugieren que la STZ afecta más a los astrocitos GFAP⁺ en el corto plazo comparado con el efecto a 95 días post inyección. Adicionalmente, observamos que los astrocitos de las ratas Sham del experimento de 95 días, mostraron una disminución de su arborización en prolongaciones más alejadas del soma (**Fig. 29A**), junto una disminución de la longitud de los procesos (**Fig. 29B**) y el número de procesos primarios (**Fig. 29C**), respecto del grupo Sham del experimento de 25 días.

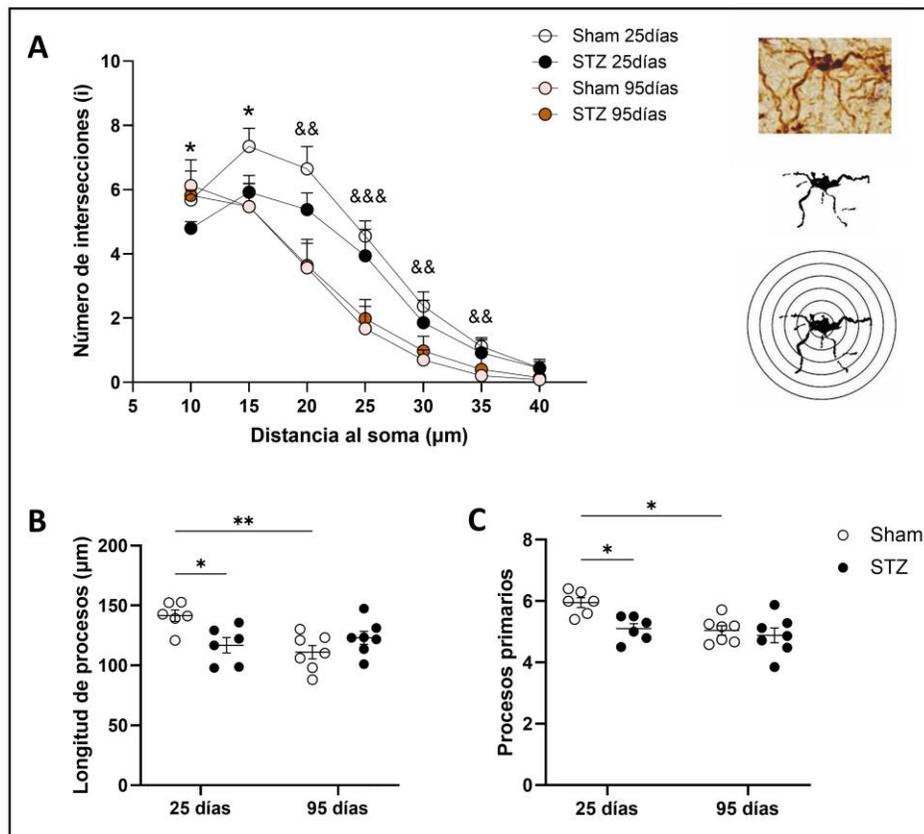


Figura 29: Análisis de Sholl de los astrocitos del SR de CA1 en el modelo de STZ-icv. Se evaluó el número de intersecciones de los procesos celulares con cada anillo espaciado de 5 µm (**A**). Se cuantificó y comparó la longitud de los procesos astrogliales, estimada mediante la suma de los valores de (i) para cada anillo, multiplicada por 5 (**B**), y el número de procesos primarios de cada célula, como el número de prolongaciones que emergen directamente desde el soma celular (**C**). Los datos se analizaron mediante ANOVA de dos factores (**B, C**), o de tres factores con medidas repetidas (**A**) y se expresaron como media ± SEM. En gráfico **A**, el símbolo * indica diferencias significativas entre Sham y STZ de 25 días, mientras que el símbolo & indica diferencias significativas entre Sham 25 días y Sham 95 días. * $p < 0,05$; & $p < 0,05$; && $p < 0,01$; &&& $p < 0,001$; &&&& $p < 0,0001$

4.2.5 Atrofia en el Stratum Radiatum de CA1 en el modelo de STZ-icv

Se estimó el volumen de una porción del SR de CA1 del hipocampo (**Fig. 30D**), y se encontró que, tanto a corto como a mediano plazo, la STZ provoca una reducción del volumen de esta región (**Fig. 30A** y

B) (t-test de Student a 25 días: $p= 0,0023$; a 95 días: $p= 0,0049$). Al comparar los cuatro grupos experimentales, aunque solo se mantuvo la diferencia significativa entre Sham y STZ en el experimento de 25 días, el factor STZ en el ANOVA fue significativo y no se encontraron diferencias entre ambos grupos inyectados con la droga (**Fig. 30C**) (ANOVA de dos factores, factor STZ: $F_{(1, 22)}= 29,32$, $p<0,0001$, factor tiempo: $F_{(1, 22)}= 1,548$ $p=0,2266$, interacción: $F_{(1, 22)}= 2,320$ $p=0,1420$). Estos resultados indican que en el modelo de EAe se observa una atrofia comparable en CA1 hipocampal tanto a corto como a mediano plazo post STZ.

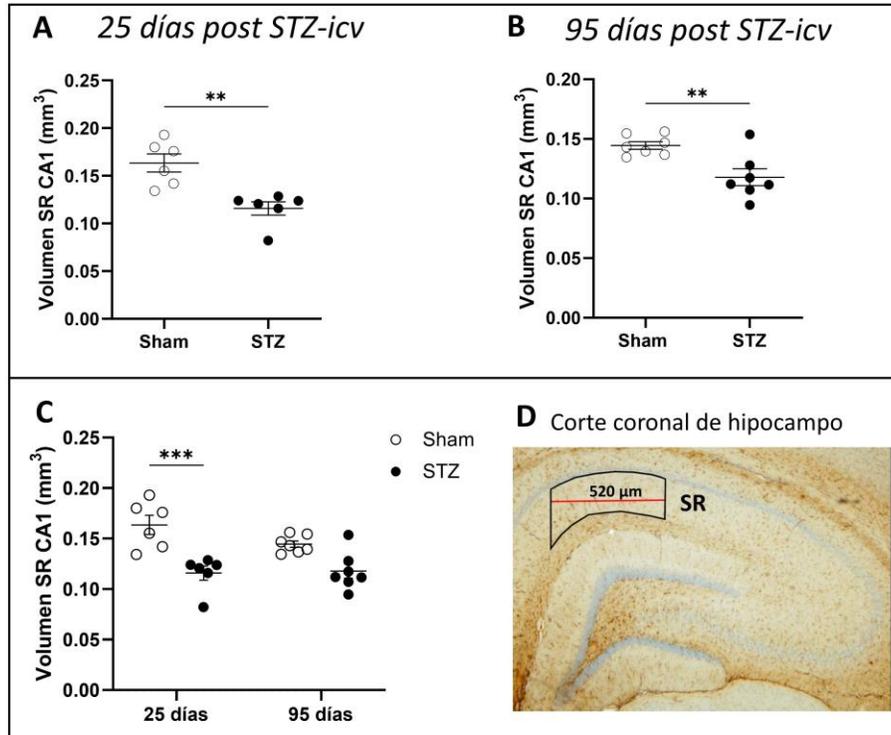


Figura 30: La STZ-icv provoca atrofia hipocampal en CA1. Volumen del SR de CA1 a 25 días (A) y a 95 días (B) post STZ. Comparación del volumen a ambos tiempos post STZ (C). Corte coronal representativo del hipocampo dorsal, rectángulo marcando la zona cuantificada (D). Los datos se analizaron mediante t-test (A, B) o ANOVA de dos factores (C), y se expresaron como media \pm SEM. ** $p< 0,01$, *** $p< 0,001$.

4.3 Discusión

El modelo de STZ-icv ha sido propuesto como un modelo de EAe ya que muestra cambios bioquímicos, estructurales y cognitivos, junto con un estado de insulino-resistencia en el cerebro, que comparte características comunes a las alteraciones encontradas en humanos con la patología (Agrawal et al., 2011; Bassani et al., 2018; Lannert & Hoyer, 1998; Salkovic-Petrisic & Hoyer, 2007). Si bien este modelo es comúnmente utilizado en rata, ha sido también propuesto como modelo en otras especies como ratón y primates no humanos (Amiri et al., 2017; El Halawany et al., 2017; Heo et al., 2011). Aunque la caracterización y validación del modelo de STZ-icv lleva más de 20 años, aún no es completa, quedando aspectos que deben continuar siendo estudiados.

Previamente se demostró que la inyección icv de STZ produce inicialmente una marcada pérdida de peso corporal (Pathan et al., 2006; Shoham et al., 2003). En concordancia con estos resultados, observamos que en ambos experimentos la STZ-icv, y no el procedimiento quirúrgico, promovió una pérdida de peso hasta aproximadamente una semana post inyección, tiempo después del cual los animales comenzaron a recuperarlo. Si bien no se conoce el mecanismo por el cual la STZ afecta al peso de los animales, se ha reportado que produce un ensanchamiento del tercer ventrículo y del espacio ventricular en general, pérdida de células endoteliales y daños en la mielina periventricular hipotalámica (Kraska et al., 2012; Shoham et al., 2003). Por el flujo del LCR (Faubel et al., 2016), la STZ inyectada en los ventrículos laterales puede llegar al tercer ventrículo, alrededor del cual lindan núcleos hipotalámicos importantes para la homeostasis energética y la regulación de la saciedad (Roger et al., 2022; Timper & Brüning, 2017), por lo cual hipotetizamos que si estas regiones se ven afectadas, podría explicar la pérdida de peso observada tras la inyección de STZ. Además, los tanicitos, células gliales que recubren la región ventral del tercer ventrículo y a las cuales se les otorga un potencial rol en el control de la alimentación y el balance energético (Bolborea & Dale, 2013), expresan GLUT2 (De los Angeles García et al., 2003). Si bien no se ha estudiado si la droga afecta a este tipo celular, es factible que lo haga ya que se ha reportado que tras una inyección ip, la STZ ingresa a las células β -pancreáticas a través de los GLUT2 (Elsner et al., 2000).

El deterioro en aprendizaje y en memoria espacial en ratas tratadas con STZ-icv fue evaluado en numerosos trabajos, principalmente a través del Morris Water Maze (MWM), a diferentes dosis de STZ (0,5-6 mg/kg), y en varios momentos tras la inyección (Agrawal et al., 2011; Grünblatt et al., 2007; Kumar & Bansal, 2018; Rostami et al., 2017). Nuestros resultados obtenidos con el LB, muestran que la memoria espacial se encuentra deteriorada por la STZ tanto en el modelo de corto, como de mediano plazo. El incremento en la latencia y en los errores cometidos demuestran que los animales STZ tienen más dificultad que los controles para recordar la ubicación del agujero de escape y que son más erráticos en su búsqueda. El aumento del número de errores se corresponde con una disminución de la frecuencia de exploración en el GS. Al menos dos componentes contribuyen a la magnitud de la frecuencia de exploración del GS, a saber, la retención de la memoria espacial y la actividad de búsqueda del objetivo, que depende principalmente de la motivación para buscar el agujero de escape. Cabe destacar que se ha observado que la inyección de STZ en ratones produce dificultades motivacionales (Amiri et al., 2017). Es importante mencionar que otros grupos han reportado, a través de evaluaciones hechas con el test de Rotarod y el uso de actofotómetro, que la STZ-icv no produce déficits motores ni afecta la actividad locomotora (Kumar & Bansal, 2018; Rostami et al., 2017).

Para evaluar si existían diferencias en la memoria de los animales por el tiempo transcurrido post STZ, realizamos una comparación de los cuatro grupos experimentales. Si bien ambos grupos STZ no difirieron significativamente entre sí en ninguno de los parámetros evaluados, la única diferencia significativa que se mantuvo entre grupo Sham y STZ corresponde al corto plazo, específicamente en los errores cometidos. Cabe destacar que una limitación de nuestro estudio en cuanto a los análisis comportamentales es el N de animales con el que contamos. Por lo tanto, es posible que las tendencias observadas en los parámetros, se vuelvan diferencias significativas al incrementar el N. Nuestros resultados sugieren que el deterioro en la memoria es más marcado a 25 días que a 95 días post STZ, el primero un periodo que puede ser considerado como agudo en comparación a tiempos más largos. Esta observación concuerda con lo reportado por el grupo de la Dra. Salkovic-Petrisic, que ha realizado estudios longitudinales para evaluar el efecto de la administración de STZ en dosis de 3mg/kg de peso corporal, a 1, 3, 6 y 9 meses post

inyección (Knezovic et al., 2015; Osmanovic Barilar et al., 2015). Sus trabajos demuestran que los efectos de la STZ en ratas siguen un patrón que podría dividirse en tres periodos: un periodo agudo comprendido dentro del primer mes post STZ, marcado por una fuerte desregulación de la cascada de señalización de insulina y déficit de memoria, que reflejan un efecto tóxico de la droga; luego un periodo subcrónico entre 1 a 3 meses post STZ en donde estos efectos son más leves ya que parecen ser parcialmente compensados, y podrían ser comparados con las fases tempranas del deterioro cognitivo en humanos (etapa de deterioro cognitivo leve); y por último un periodo crónico entre 3 a 9 meses post STZ en donde se observa una progresión lenta de la patología, generando un estado de insulino-resistencia en el cerebro que se acompaña con progresión de déficit cognitivos. Tanto los cambios agudos como cambios crónicos inducidos por STZ-icv podrían representar una valiosa herramienta, los primeros para explorar la posible etiopatogenia, y los segundos para evaluar nuevos enfoques modificadores de la enfermedad.

La relación entre el hipocampo y las tareas espaciales está bien documentada. Efectivamente, experimentos en ratas con lesiones hipocampales seguidas del MWM, mostraron que la memoria espacial se veía afectada en el grupo lesionado (E. Moser et al., 1993; M. B. Moser et al., 1995). Esto se explica con la presencia de las “*place cells*”, descritas por primera vez en el hipocampo de la rata (O’Keefe & Dostrovsky, 1971), pero que también están documentadas en humanos (Ekstrom et al., 2003). Estas células proporcionan una representación estable de la ubicación de un animal, independientemente de su orientación (O’Keefe & Conway, 1978). Nuestros resultados del LB indicarían que esta región se encuentra afectada por la STZ tanto a corto como a mediano plazo post inyección.

Los pacientes con EA no solo tienen dificultad en recordar eventos en su contexto espacial y temporal, sino que también presentan dificultad en recordar información específica sobre objetos y/o su locación. Es por eso que además de los laberintos, los test diseñados para explorar la memoria de reconocimiento son importantes para la caracterización de los modelos de EA, y se utilizan ampliamente en baterías de tareas conductuales diseñadas para fenotipar estos modelos, incluyéndose en evaluaciones preclínicas de nuevos enfoques terapéuticos. Si bien este no fue un trabajo longitudinal, los resultados sugieren que el deterioro en este tipo de memoria causado por STZ es evidenciado a corto plazo post inyección, pero que también perdura si se continúa con un experimento de mayor tiempo, hasta al menos 3 meses. En concordancia, previamente se describió en el modelo un déficit de memoria de reconocimiento de objetos a 5 y 15 semanas post STZ (Rostami et al., 2017). Finalmente, los déficits en la memoria espacial y de reconocimiento evaluada por los laberintos o el test RO, también son reportados en múltiples ratones transgénicos modelos de la EA (Webster et al., 2014).

Actualmente no hay un consenso general sobre el rol del hipocampo en la memoria de reconocimiento como si ocurre para la memoria espacial. Esto se debe a resultados controversiales publicados, ya que algunos trabajos muestran que lesiones inducidas en esta región de los roedores no afectan el resultado de los test (Forwood et al., 2005; Mumby, 2001), mientras que otros demuestran lo contrario (Broadbent et al., 2004; Cohen et al., 2013; Tuscher et al., 2018). Es probable que estas discrepancias se deban a los protocolos de test utilizados, el tipo de objetos, el tiempo transcurrido entre las pruebas de entrenamiento y reconocimiento, el tipo de lesión generada, el momento de la inducción de la lesión y, por último, diferencias debidas a la cepa y al sexo de los animales. Sin embargo, es necesario considerar que para ambos tipos de memoria, otras regiones cerebrales también son importantes, como la corteza entorrinal y la corteza prefrontal medial (Akirav & Maroun, 2006; Chao et al., 2020; Pilly & Grossberg, 2012; Tuscher et al., 2018).

En la EA, la importancia del hipocampo para la memoria se evidencia al encontrarse altamente afectado desde momentos tempranos en la enfermedad (Jack et al., 2011; L. Su et al., 2018). En efecto, estudios por imágenes muestran que una reducción del volumen del hipocampo se correlaciona con la disfunción cognitiva global y el rendimiento de la memoria (Elgh et al., 2006; Stoub et al., 2006). Consecuentemente, hemos enfocado nuestros estudios bioquímicos e histológicos en esta región cerebral.

Como se mencionó en la introducción, las características histopatológicas marcadoras de la EA son los ONF y las placas amiloides, conformados por la proteína tau hiperfosforilada y péptidos β A, respectivamente. Hemos observado que la STZ-icv provoca, en el corto plazo, un aumento de la fosforilación de Tau en Ser396, y un aumento de la expresión del péptido β A. La fosforilación del epítipo Ser396 de Tau está involucrada en la pérdida funcional de la polimerización de tubulina y en cambios en su estado de compactación que inducen su agregación, según lo demostrado por experimentos *in vitro* (Evans et al., 2000; Jeganathan et al., 2008; Kiris et al., 2011). Acorde a nuestros resultados, otros grupos muestran un incremento de la fosforilación de este epítipo tras la inyección de STZ en la misma dosis (3 mg/kg), luego de 21 días (Dehghan-Shasaltaneh et al., 2016), 29 días (Xu et al., 2018) y 42 días (Du et al., 2014) después de la inyección. Por otro lado, el aumento de expresión que hemos observado del péptido β A, es concordante con experimentos en este modelo, que reportan un incremento a través de técnicas de ELISA o IHQ (C. Wu et al., 2018; W. Yang et al., 2014; Yin et al., 2016).

Sin embargo, en el mediano plazo no hemos observado aumentados los niveles de pTau ni de β A. Nuestro resultado de pTau no concuerda con el aumento de la fosforilación en el epítipo PHF1, que comprende la fosforilación en Ser 396 y 404, reportado por Osmanovic Barilar et al., 2015, y no hay otros trabajos que hayan estudiado la fosforilación en Ser396 en ratas inyectadas con la misma dosis de STZ y al mismo tiempo post inyección. Una limitación de nuestro estudio es no poseer información acerca del estado de fosforilación de otros residuos aminoacídicos de Tau. Es posible que luego de una fosforilación aumentada en el estadio agudo post STZ, estos cambios post traduccionales se pierdan a tiempos más largos. Efectivamente, en el modelo de STZ-icv no se ha reportado la formación de ONF, lo que constituye una limitación de este modelo respecto a ratones transgénicos.

Con respecto a los niveles de expresión del péptido β A, hipotetizamos que la falta de diferencia entre los grupos Sham y STZ podría deberse a un aumento en la relación del péptido β A insoluble/soluble que afecte la interacción anticuerpo-epítipo. Si bien se ha descrito la formación de placas amiloides en el hipocampo y la corteza de animales inyectados con STZ a una dosis mayor (por ejemplo, dos inyecciones de 3mg/kg) (Afshar et al., 2018), o a tiempos más prolongados (6 meses) (Knezovic et al., 2015), no hemos investigado su presencia en nuestros experimentos, lo que resultaría interesante de realizar.

La microglía y los astrocitos reactivos contribuyen a la patogénesis de la EA. Si bien la gliosis reactiva es un proceso complejo que involucra cambios transcripcionales, bioquímicos y morfológicos, es identificable por una marcada hipertrofia celular. Nuestros resultados muestran que en el hipocampo, tanto a corto como a mediano plazo, la microglía responde a la STZ cambiando su morfología hacia un fenotipo reactivo, y aumentando su número. Esta última observación no es confirmativa, pero si indicativa de proliferación. Sin embargo, la comparación de los cuatro grupos experimentales mostró que la respuesta de estas células no es la misma dependiendo el momento de evaluación. Específicamente, observamos que el número de células Iba1⁺ es mayor a 25 días que a 95 días post STZ, lo que sugiere que en una etapa aguda post STZ, la microglía responde proliferando rápidamente, pero en la etapa subcrónica,

estas células si bien numerosas aun respecto al control, no siguieron proliferando. Resta por saber si a mayor tiempo post STZ, la microglía logra recuperar una densidad homeostática.

Resulta interesante pensar acerca de las posibles consecuencias para el cerebro de una proliferación desmedida de la microglía. Justamente, la pérdida del control homeostático microglial, en la forma de microgliosis, es considerada un sello distintivo de la progresión de diversas neuropatologías. Por ejemplo, utilizando un modelo de ratón de la enfermedad priónica se demostró que hay un aumento dramático en el número de células microgliales, en el cual la vía regulada por la activación del receptor de CSF1 (CSF1R) es un modulador clave de la respuesta proliferativa (Gómez-Nicola et al., 2013). Estos autores y otros (Olmos-Alonso et al., 2016) también demostraron que bloquear la proliferación microglial retrasa significativamente la progresión de la enfermedad, lo que indica una contribución perjudicial global de las células microgliales, al menos en los contextos específicos estudiados. Se demostró que el CSF1R está sobreexpresado en las células microgliales en la EA, indicando una actividad prominente de esta vía (Akiyama et al., 1994). Por otro lado, un trabajo mostró que la microglía de tejido hipocampal humano con EA es marcada con anticuerpos dirigidos contra el antígeno nuclear de células proliferantes (Marlatt et al., 2014), aunque otros autores demuestran que la microglía no prolifera en la corteza de muestras humanas patológicas (Serrano-Pozo et al., 2013). La expansión de las células microgliales también ha sido demostrada en modelos transgénicos de EA, normalmente alrededor de placas amiloides (Frautschy et al., 1998; Kamphuis et al., 2012a). Por lo tanto, es posible que la microgliosis causada por la inyección de STZ, resulte perjudicial para la homeostasis del cerebro y que contribuya a los déficits de memoria observados. Efectivamente, el bloqueo de la proliferación microglial, mejoró el rendimiento en tareas de memoria y comportamiento en un modelo transgénico de EA (Olmos-Alonso et al., 2016).

Sin embargo, es importante mencionar que existe un debate abierto sobre si las nuevas células microgliales, en el contexto de enfermedades neurodegenerativas, provienen de microglía local (Y. Wang et al., 2016) o de monocitos periféricos infiltrados en el SNC (Jay et al., 2015). La hipótesis de infiltración de monocitos se ve sustentada por trabajos *in vitro*, que demuestran que en el contexto de EA, la barrera endotelial se vuelve permeable a células y también a factores inflamatorios liberados por las células inmunitarias periféricas que impactarían en el perfil de expresión de las células gliales. Por ejemplo, se demostró que la expresión de TNF- α por la microglía tras la exposición a péptidos β A, promueve la migración de linfocitos T a través de células endoteliales (Y. M. Yang et al., 2013), y que la IL-6, otra citoquina liberada por la glía reactiva, aumenta la permeabilidad endotelial a través de alteraciones en la distribución ultraestructural de las uniones estrechas y cambios morfológicos en la forma celular (Desai et al., 2002). El origen (residente o periférico) de las células mieloides alrededor de las placas amiloides sigue siendo muy debatido. En nuestro trabajo, no hemos evaluado la integridad de la BHE, ni tampoco ha sido reportado por otros autores en este mismo modelo, lo que constituye una cuestión pendiente a investigar.

Por otro lado, la comparación de la microglía reactiva entre los cuatro grupos, no mostró diferencia significativas entre los grupos STZ. El aumento de la reactividad de la microglía en los animales STZ respecto al control, podría tener consecuencias sobre el perfil de citoquinas liberadas por estas células. Nuestro análisis no nos proporciona información acerca del fenotipo de la microglía, es decir si presenta un perfil principalmente proinflamatorio o antiinflamatorio, o si ambas poblaciones se encuentran presentes. Sin embargo, debido a nuestros resultados de comportamiento, es probable que esta reactividad conduzca a la liberación de citoquinas proinflamatorias (IL-1 α , TNF α , and C1q), que se ha documentado exacerban la reacción de los astrocitos hacia un fenotipo neurotóxico (Liddelw et al.,

2017). La microglía reactiva también juega un rol importante en la fagocitosis de sinapsis, contribuyendo a la pérdida de conexiones entre las neuronas y por ende, al deterioro cognitivo (Hansen et al., 2018).

Los astrocitos reactivos se encuentran en regiones cerebrales vulnerables en pacientes con EA. La proteína GFAP es el marcador de astrocitos reactivos más ampliamente utilizado, dado que su aumento se produce en diversos tipos de trastornos del SNC, es encontrado en respuesta temprana a la lesión y, además, es un indicador de la reactividad astrocitaria, detectable incluso en ausencia de muerte neuronal manifiesta (Escartin et al., 2021). Por ejemplo, los niveles de expresión de GFAP se encuentran incrementados en humanos antes de la aparición de síntomas clínicos y aumentan con los estadios de Braak. Este fenómeno se observa en la corteza entorrinal y en el hipocampo, con una gradual progresión a los lóbulos temporal, frontal y parietal (Carter et al., 2012; Simpson et al., 2010). Evaluamos la expresión de GFAP y el número de células GFAP-ir en el SR de CA1. A diferencia de la microglía, no se observaron diferencias en el número de astrocitos GFAP⁺, lo cual sugiere que estas células no proliferaron, en concordancia con lo reportado en otros modelos de EA. Originalmente, la definición de reactividad astrocitaria incluía la noción de proliferación, debido a la interpretación errónea de división celular por el número de células GFAP⁺ aumentado tras una lesión (Dimou & Götz, 2014). Este problema se debe a que la mayoría de los astrocitos del SNC de roedores adultos expresan GFAP a niveles muy bajos en condiciones fisiológicas, salvo en el hipocampo, una región en la cual los astrocitos tienen de por sí niveles de expresión de GFAP más alto que otras regiones. Esto podría explicar que no hayamos observado un aumento del número de células GFAP⁺, sino un aumento de su IRA. Pruebas recientes basadas en la incorporación de BrdU o marcaje con Ki67 revelan que la proliferación astrocítica es muy limitada. El valor exacto depende del modelo, la edad y el método de detección. Por ejemplo, los astrocitos reactivos no proliferan en el modelo de ratón APP/PS1dE9 de EA (Kamphuis et al., 2012b), y representan menos del 3% del total de células proliferantes en el modelo de ratón APPPS1 de EA (Sirko et al., 2013) y menos del 7% en un modelo de esclerosis lateral amiotrófica (Lepore et al., 2008). En la corteza temporal de pacientes con EA, las células GFAP⁺ se cuantificaron cuidadosamente mediante el marcaje conjunto con marcadores ubicuos de astrocitos (glutamina sintasa o el miembro L1 de la familia de la enzima aldehído deshidrogenasa), y se concluyó que las reacciones astrocíticas en la EA se deben en gran medida a un cambio fenotípico de las células gliales existentes, más que a una generación de nuevas células gliales (Serrano-Pozo et al., 2013).

En cuanto a la expresión de GFAP en el SR de CA1, hemos obtenido un resultado esperable de acuerdo a lo observado en humanos con EA y en otros modelos murinos, ya que se encontró aumentada tanto a corto como a mediano plazo post STZ. Adicionalmente, al comparar los cuatro grupos experimentales, observamos que la reacción de los astrocitos a la STZ fue mayor al ser evaluada a 25 días respecto a 95 días, lo que una vez más concuerda con nuestras observaciones de que el corto plazo post inyección, se corresponde a un periodo agudo en el cual las reacciones de las células gliales se encuentran exacerbadas. El aumento del contenido de GFAP sugiere remodelamiento astrocitario, el cual acompaña al proceso de reactividad, aunque para una caracterización más profunda de la reacción de estas células es necesaria la diversificación de técnicas empleadas, el complemento con otros marcadores, y un análisis de perfil transcriptómico. La respuesta de los astrocitos frente a la STZ es rápida, ya que se ha observado un aumento de la reactividad a una semana post STZ tanto en el hipocampo (J. P. A. Dos Santos et al., 2018), como en la región septo-estriatal, rodeando los ventrículos laterales, lugar de inyección de la STZ (Bassani et al., 2018; Kraska et al., 2012).

Si bien los astrocitos del grupo STZ a 25 días presentaron un aumento del IRA de GFAP, el análisis de Sholl mostró que dichas células presentaban una reducción en su complejidad de arborización, por lo que hipotetizamos que se encontraban hipertrofiadas, tanto en sus prolongaciones como en el soma. Sin embargo, a mediano plazo no se observaron diferencias en la arborización entre los grupos Sham y STZ, por lo que el aumento del IRA de GFAP a este tiempo podría también explicarse con una hipertrofia celular. Fue notoria una disminución en la arborización de los astrocitos de las ratas Sham del experimento de 95 días (6 meses de edad) respecto de las del experimento de 25 días (4 meses de edad). Sin embargo, esta diferencia no se evidenció en las intersecciones cercanas al soma, sino en aquellas a partir de los 20 μm de distancia. Cabe considerar que las IHQ para estos dos experimentos fueron realizadas en diferentes momentos, y por lo tanto es posible que existan diferencias en el marcaje en cuanto a las prolongaciones más finas. De ser de interés una caracterización de la morfología astrocitaria en animales de diversa edad, sería necesario realizar un nuevo estudio, en simultaneo, y en lo posible con otro marcador distinto de GFAP (que solo marca las ramificaciones principales del citoesqueleto), o realizando un marcaje celular con una técnica diferente, para estudiar diferencias finas en la arborización de las células.

Como se mencionó anteriormente, una reducción del volumen hipocampal se correlaciona con déficit cognitivos y problemas de memoria. En nuestro estudio, la administración de STZ-icv resultó en la reducción del volumen de SR de CA1 del hipocampo dorsal, tanto a corto como a mediano plazo post STZ. Al comparar los cuatro grupos experimentales, no encontramos diferencias entre los grupos tratados con STZ, aunque solo el grupo de 25 días mantuvo la diferencia significativa comparado con su control, en concordancia con lo observado en los resultados de memoria espacial. Esta sub-área del hipocampo es una de las más afectadas en la EA y se propuso como un potencial biomarcador temprano para detectar la enfermedad en la etapa de deterioro cognitivo leve (Su et al. 2018).

Aunque los cambios observados en las ratas tratadas con STZ-icv son reproducidos por múltiples grupos de investigación, es desconocido si la STZ puede penetrar desde el LCR al parénquima cerebral hasta llegar a las zonas que se ven afectadas en estos estudios, aunque la difusión de drogas por el parénquima podría no ser factible (Pardridge, 2011). Es posible que el deterioro de comportamiento y los daños observados en el cerebro sean consecuencia de daños generados por la droga en los sitios cercanos a la inyección, que luego pueden trasladarse a daño en regiones más alejadas. Por ejemplo, el septum que rodea a los ventrículos laterales y se ve afectado por la STZ (Kraska et al., 2012), tiene proyecciones colinérgicas sobre varias regiones corticales, como la corteza entorrinal y cingulada (Woolf, 1991), y el hipocampo (Fitz et al., 2006; Niewiadomska et al., 2009). Estas conexiones forman el sistema septohipocampal, implicado en el aprendizaje espacial, la memoria a corto plazo y la atención (Kesner, 1988).

Si bien en este trabajo no hemos evaluado aspectos relacionados al mecanismo de acción de la STZ-icv, cabe mencionar que se han propuesto varias hipótesis para explicar las alteraciones cerebrales inducidas por esta droga: 1) a través de la inducción de estrés oxidativo severo (Pathan et al., 2006; Shoham et al., 2007; Szkudelski, 2001; Veerendra Kumar & Gupta, 2003); 2) a través de la inducción de un estado cerebral de resistencia a la insulina (Plaschke & Hoyer, 1993; Salkovic-Petrisic et al., 2006; Salkovic-Petrisic & Hoyer, 2007); y 3) a través de un efecto generalizado de la disminución del metabolismo energético (Duelli et al., 1994; Lannert & Hoyer, 1998). Por lo tanto, dichos procesos podrían estar ocurriendo adicionalmente a nuestras observaciones contribuyendo directa o indirectamente al deterioro de la memoria en los animales inyectados con STZ, tanto a corto como a mediano plazo.

4.4 Conclusión

Evaluando el modelo de EAe de corto y mediano plazo, generado por la inyección de STZ-icv a 25 y 95 días respectivamente, concluimos que las respuestas a la STZ varían al menos en intensidad según el momento en el que se evalúe el cerebro y el comportamiento de los animales, observación que debe ser tomada en cuenta para el diseño de estrategias terapéuticas. Específicamente, identificamos déficit de memoria espacial y de reconocimiento tanto a corto como a mediano plazo. Sin embargo, notamos que las alteraciones a nivel bioquímico y celular en el hipocampo no fueron las mismas según el tiempo de evaluación post STZ. Nuestros resultados muestran que la respuesta aguda a la STZ, a 25 días post inyección, es más pronunciada que a 95 días luego de la administración de la droga. Si bien a ambos plazos evaluados se mantuvo la atrofia en CA1, no detectamos un aumento de la expresión del péptido β A y de pTau a mediano plazo, y adicionalmente detectamos variación en la reactividad glial entre ambos experimentos. Nuestros resultados proporcionaron una referencia importante para futuros ensayos que exploren el potencial de diversas terapias, de los cuales consideramos apropiado emplear enfoques con un efecto rápido y potente durante un estadio temprano post STZ, y tratamientos de perfil más moderado y regulador en un estudio a mediano plazo post STZ.

5 Capítulo V: Abordajes terapéuticos en el modelo de STZ-icv

Teniendo en cuenta los resultados previos de nuestro laboratorio de terapia génica icv con IGF1 (**ver sección 1.5.3**) en los que la expresión del IGF1 a corto plazo indujo resultados prometedores decidimos evaluar esta intervención en el modelo de STZ-icv, en un período de tiempo similar. En el caso de la terapia génica im con timulina, debido a que la expresión de nuestro RAd-FTS se mantuvo por meses (**ver sección 1.5.4**) y que suponemos que su acción no es tan potente como en el caso del IGF1 sino más bien moduladora, decidimos plantear un estudio a mediano plazo. De igual manera, en base a nuestro estudio previo de terapia celular iv (**ver sección 1.6.1.1**, Zappa Villar et al., 2020) decidimos optar por un estudio a igual tiempo para evaluar el efecto del secretoma de células madre mesenquimales en el modelo de EAe.

5.1 Objetivos

- Implementar terapia génica de corto plazo con IGF1 en ratas macho del modelo de EAe. Administrar la terapia por vía icv, y analizar su impacto en el comportamiento y en el cerebro de los animales a 25 días post STZ-icv.

- Implementar terapia génica de mediano plazo con timulina en ratas macho del modelo de EAe. Administrar la terapia por vía intramuscular, y analizar su impacto en el comportamiento y en el cerebro de los animales a 3 meses post STZ-icv.

- Implementar terapia celular con el secretoma de células madre mesenquimales que sobreexpresen o no IGF1, en ratas macho del modelo de EAe. Administrar la terapia por vía intranasal y analizar su impacto en el comportamiento y en el cerebro de los animales a 3 meses post STZ-icv.

5.2 Resultados de terapia génica con IGF1

5.2.1 La transferencia del gen IGF1 restauró el comportamiento en el modelo de STZ-icv

Para evaluar si la terapia con IGF1 impactó en el comportamiento alterado en el modelo de EAe, realizamos diferentes test comportamentales. Se observó que la inyección de STZ indujo una drástica disminución de la cantidad de canicas enterradas en el test de MB, comportamiento que mejoró significativamente con la sobreexpresión de IGF1 (**Fig. 31A, B**) (ANOVA de un factor de datos transformados logarítmicamente, $F_{(2,18)}= 41,26$, $p < 0,0001$), aunque no llegó a igualar al grupo Sham.

La memoria de reconocimiento fue evaluada a través del test RO. El grupo STZ mostró un aumento significativo en el tiempo de latencia para explorar el objeto novedoso respecto al grupo Sham, mientras que los animales que recibieron la terapia con IGF1 no difirieron del Sham (**Fig. 31C**) (ANOVA de un factor, $F_{(2,18)}= 5,757$, $p= 0,0118$). Al evaluar el índice de discriminación del objeto nuevo, observamos que las ratas control no presentaron afectada la memoria (con I.D. > 0), mientras que las ratas con STZ mostraron su memoria deteriorada. El tratamiento con IGF1 restauró dicho comportamiento (**Fig. 31D**) (t-test para una media: Sham: $p=0,0032$, STZ $p=0,4113$, STZ+IGF1 $p=0,0394$).

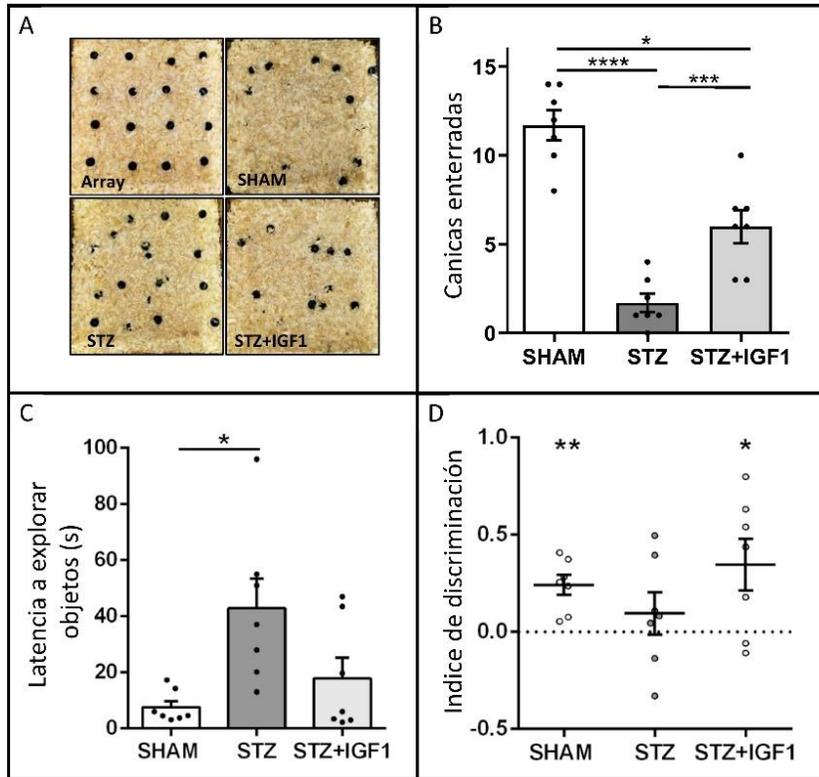


Figura 31: Efecto de la transferencia de IGF1 sobre el rendimiento conductual en los test de enterramiento de canicas (MB) y de reconocimiento de objetos nuevos (RO). En la prueba de MB, la transferencia de IGF1 provocó un aumento significativo del número de bolitas enterradas (A, B), un parámetro afectado por la STZ. En el RO, en las ratas tratadas con STZ, se produjo un aumento significativo de la latencia (C), junto con una reducción del índice de discriminación (D); el tratamiento con IGF1 restauró el déficit de memoria. Los datos se analizaron mediante ANOVA de un factor (B y C) o contrastando el índice de discriminación con el nivel de azar 0 (t-test de una muestra) (D). Todos los datos se representaron como media \pm SEM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Por otro lado, evaluamos la memoria espacial en el LB. Se observó un aumento de la latencia para alcanzar el agujero meta en el grupo STZ. Este parámetro se redujo significativamente por el tratamiento con IGF1 (Fig. 32A) (ANOVA de un factor, $F_{(2,18)} = 9,161$, $p = 0,0018$). Por otro lado, la cantidad de errores cometidos fue significativamente mayor en las ratas STZ respecto a los animales Sham. Los animales con IGF1 no mostraron dicho aumento en los errores aunque esta medida no se restauró completamente (Fig. 32B) (ANOVA de un factor, $F_{(2,18)} = 6,646$, $p = 0,0069$).

El comportamiento depresivo se observa en pacientes con EA. En este sentido, en el NF registramos un aumento en el tiempo de inmovilidad de las ratas STZ. Esta medida se restableció a niveles normales mediante el tratamiento con IGF1 (Fig. 32E) (ANOVA de un factor, $F_{(2,18)} = 4,508$, $p = 0,0259$).

En conclusión, la STZ-icv provocó un grave déficit de comportamiento, alterando la conducta típica de especie (enterramiento de objetos), afectando la memoria e incrementando el comportamiento similar a la depresión. Estas alteraciones fueron restauradas en algunos casos parcialmente, y en otros totalmente, por el tratamiento con IGF1.

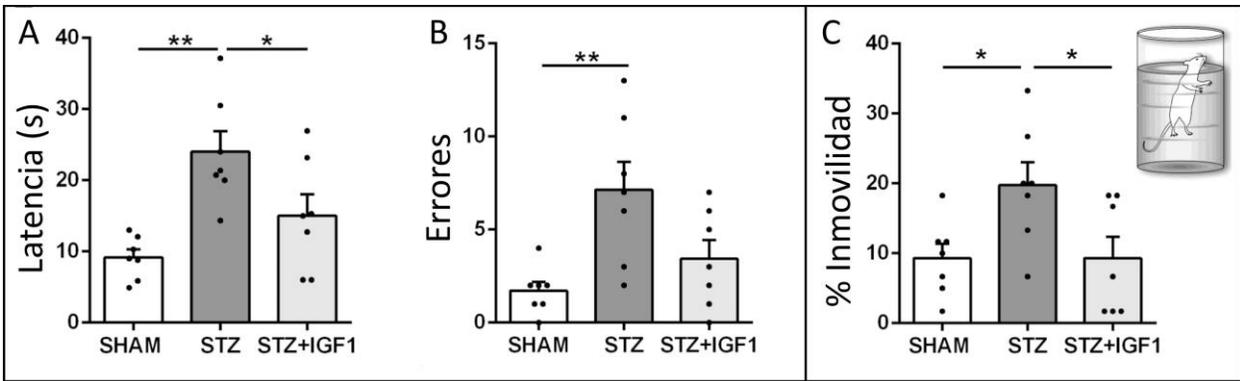


Figura 32: Efecto de la transferencia de IGF1 sobre el rendimiento conductual en el laberinto de Barnes (LB) y el test de nado forzado (NF). Se observó un aumento de la latencia en la prueba de la memoria (PT) (A) y de los errores (B) a la caja de escape por parte de los animales STZ, y una disminución en el grupo STZ + IGF1. En la prueba de NF, la STZ aumentó el comportamiento de inmovilidad y el tratamiento con IGF1 lo restauró a niveles normales (C). Los datos se analizaron mediante ANOVA de un factor y se representaron como media \pm SEM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

5.2.2 La transferencia del gen IGF1 activó su señalización en el hipocampo del modelo de STZ-icv

Para evaluar el efecto de la transferencia icv del gen IGF1 en el hipocampo, realizamos WB de extractos de proteínas del hipocampo y evaluamos los niveles de proteínas relevantes para la señalización de IGF1 y la patología de la EA. Curiosamente, las ratas con STZ mostraron niveles significativamente más altos de la subunidad α del IGF1R en comparación con las ratas Sham. Los animales STZ+IGF1 mostraron a su vez una mayor expresión de esta subunidad del receptor, pero esta no superó significativamente los niveles de las ratas STZ (**Fig. 33A**) (ANOVA de un factor, $F_{(2,18)} = 9,121$, $p = 0,0018$). Por otro lado, los niveles de la subunidad β del IGF1R fueron comparables entre los tres grupos (**Fig. 33B**) (ANOVA de un factor, $F_{(2,18)} = 0,7603$, $p = 0,4819$).

Un mediador clave de la señalización de IGF1 es la quinasa Akt, que se activa por fosforilación. Se observaron niveles significativamente más altos en la relación pAkt/Akt en los animales tratados con IGF1 (**Fig. 33C**) (ANOVA de un factor, $F_{(2,18)} = 3,991$, $p = 0,0368$). Como se demostró anteriormente en este modelo, registramos un aumento significativo de pTau en el grupo STZ. Es importante destacar que este aumento se restableció a los niveles de referencia tras la terapia génica con IGF1 (**Fig. 33D**) (ANOVA de un factor, $F_{(2,18)} = 5,798$, $p = 0,0114$). Por lo tanto, el enfoque de terapia génica con IGF1 activó la señalización del IGF1 en el hipocampo y disminuyó los niveles de pTau aumentados en el modelo de rata de EAe.

5.2.3 La transferencia del gen IGF1 moduló la población microglial del hipocampo

Como se mostró en el **capítulo IV**, las células microgliales del hipocampo responden a la inyección de STZ-icv. Para analizar el efecto del IGF1 en la población microglial, evaluamos el número de células microgliales totales y reactivas Iba1⁺ en el GD (**Fig. 34A-C**) y en el SR de CA1 (**Fig. 34D-F**). En las ratas STZ, observamos un aumento significativo de las células microgliales reactivas en CA1 (**Fig. 34H**), pero no en el GD (**Fig. 34G**). Sin embargo, la terapia génica con IGF1 incrementó la reactividad de estas células en el GD (ANOVA de un factor; GD %reactivas: $F_{(2,18)} = 7,180$, $p = 0,0051$; SR %reactivas: $F_{(2,18)} = 9,026$, $p = 0,0019$).

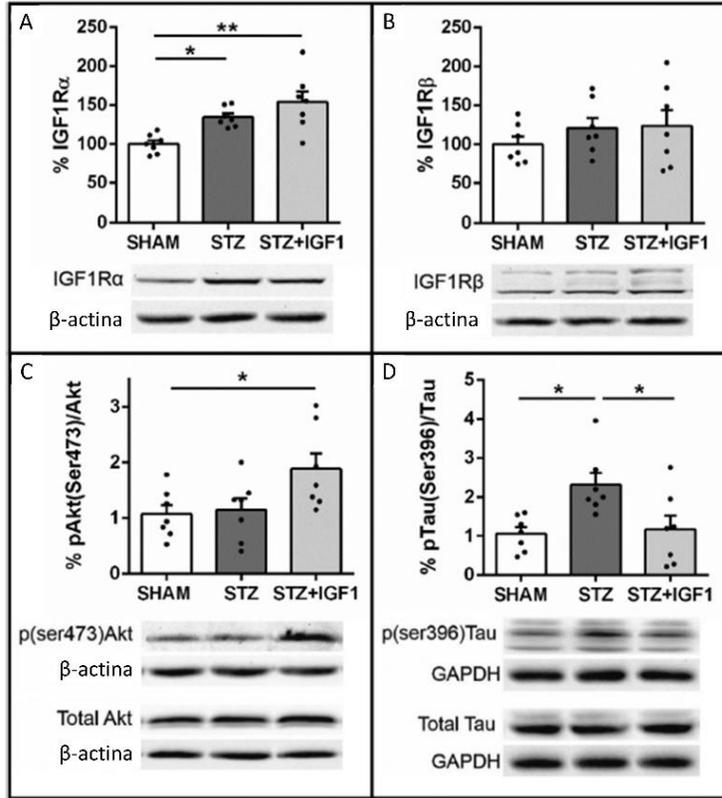


Figura 33: Aumento de la señalización de IGF1 en el hipocampo. Las proteínas del hipocampo se detectaron mediante WB y se normalizaron con β -actina (A-C) o GAPDH (D). La inyección de STZ aumentó los niveles de IGF1R α comparado a las ratas Sham (A); la media de expresión de IGF1R α en los animales STZ+IGF1 fue la mayor de los tres grupos, aunque no superó significativamente los niveles de las ratas STZ (A). Las medidas de IGF1R β fueron comparables entre los tres grupos (B). Los animales tratados con IGF1 mostraron los niveles más altos de pAkt(Ser473)/Akt (C). El aumento de la inmunorreactividad de la proporción de Tau fosforilada (pTau(Ser396)/Tau) se restableció en los animales STZ tras el tratamiento con IGF1 (D). Los datos se analizaron mediante ANOVA de un factor y se representaron como media \pm SEM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

Adicionalmente, la terapia ocasionó un aumento del número células microgliales comparado a los grupos experimentales restantes (**Fig. 34G, H**) (ANOVA de un factor; GD totales: $F_{(2,18)} = 23,72$, $p < 0,0001$; $p = 0,0051$; SR totales: $F_{(2,18)} = 78,21$, $p < 0,0001$). Este aumento en la microglía reactiva del grupo tratado con IGF1 no informa acerca del perfil de las células, pudiendo estar ejerciendo acciones anti o proinflamatorias.

Dado que la expresión de enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) se asocia a la microglía reactiva proinflamatoria (Possel et al., 2000; Sheng et al., 2011), realizamos WB en extractos de proteínas del hipocampo para cuantificar los niveles de las isoformas inducible y neuronal (nNOS) de dicha enzima. Aunque no observamos diferencias entre los grupos para los niveles de nNOS (**Fig. 35A**) (ANOVA de un factor; $F_{(2,18)} = 3,124$, $p = 0,0685$), encontramos que la inyección de STZ provocó un aumento significativo de la expresión de la proteína iNOS en el hipocampo en comparación con los animales de control, mientras que en el grupo STZ+IGF1 dicho aumento no se observó (**Fig. 35B**) (ANOVA de un factor, $F_{(2,18)} = 3,812$, $p = 0,0417$). Concluimos que la transferencia del gen IGF1 impactó en las células microgliales del hipocampo, aumentando esta población y su reactividad, probablemente hacia un fenotipo antiinflamatorio.

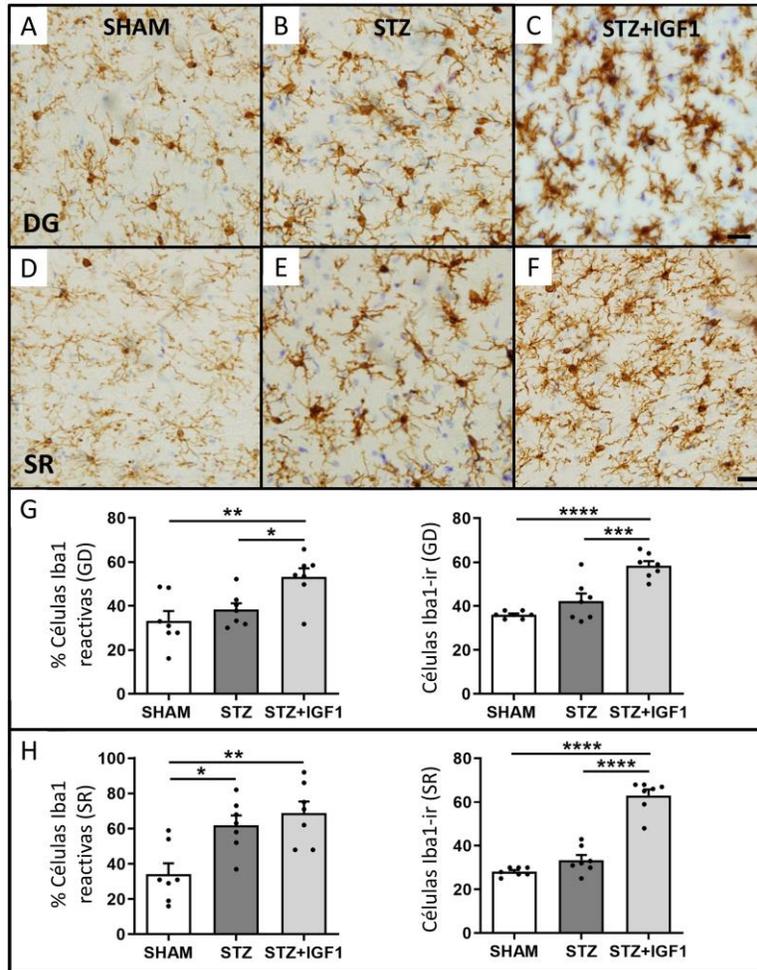


Figura 34: Efecto de la transferencia de IGF1 sobre las células microgliales Iba1 inmunorreactivas (ir) en el giro dentado (GD) y el Stratum radiatum (SR) del hipocampo. Secciones coronales en animales representativos de cada grupo: Sham (GD: A; SR: D), STZ (GD: B; SR: E), y STZ+IGF1 (GD: C; SR: F), mostrando células Iba1-ir. Análisis del % de células Iba1-ir reactivas y totales (GD: G; SR: H); obsérvese un aumento del número y de la reactividad de las células Iba1-ir causado por la transferencia de IGF1. Barra de escala: 20 μ m. Los datos se analizaron mediante ANOVA de un factor y se representaron como media \pm SEM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

5.2.4 La transferencia del gen IGF1 restauró la población neuronal inmadura y los niveles de proteínas sinápticas

En este estudio nos centramos en las neuronas del GD maduras (**Fig. 36A-C**) e inmaduras (**Fig. 36D-F**), encontrándose en la capa granular y SGZ, respectivamente. En primer lugar, estudiamos las células inmunorreactivas para NeuN y no encontramos diferencias en la inmunorreactividad entre los grupos (**Fig. 36G**) (ANOVA de un factor, $F_{(2,18)} = 1,258$, $p = 0,3081$). Para evaluar las neuronas inmaduras, examinamos el número de células DCX-ir, observando que la STZ disminuye fuertemente su número y que el tratamiento

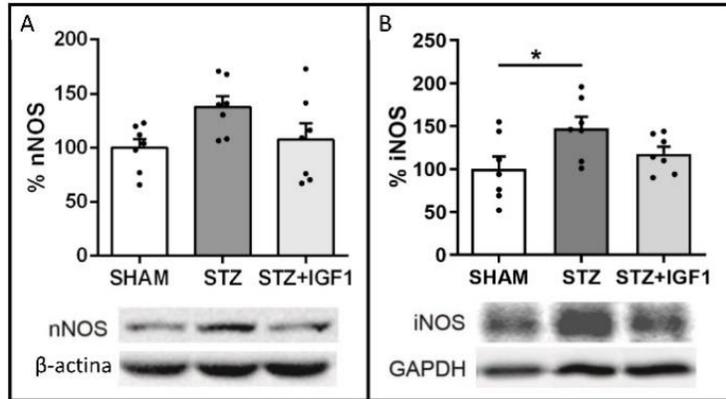


Figura 35: Aumento de la expresión de iNOS por STZ-icv. Las proteínas del hipocampo se detectaron mediante WB y se normalizaron con β -actina (A) o GAPDH (B). La expresión de nNOS no mostró diferencias entre los grupos (A), mientras que la STZ-icv aumentó la expresión de iNOS, cambio que no se registró en el grupo tratado con IGF1 (B). Los datos se analizaron mediante ANOVA de un factor y se representaron como media \pm SEM. * $p < 0,05$

con IGF1 los restablece a niveles comparables a los de los animales Sham (**Fig. 36H**) (ANOVA de un factor, $F_{(2,18)} = 7,661$, $p = 0,0039$).

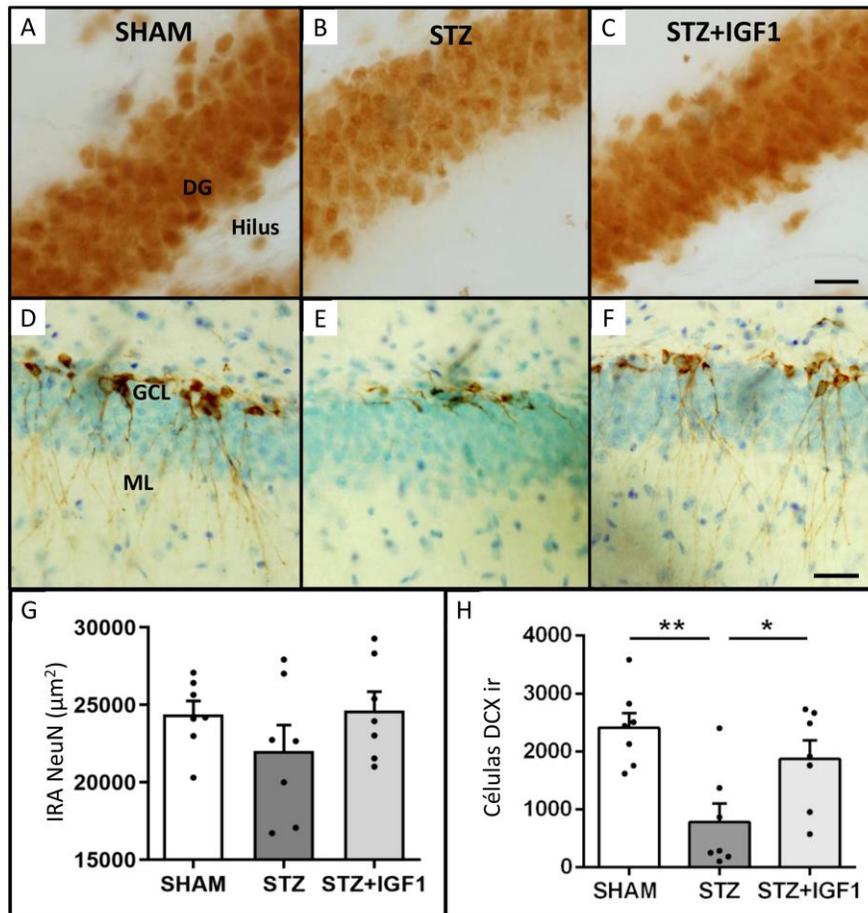


Figura 36: Leyenda en próxima página

Figura 36: Efecto de la transferencia génica de IGF1 sobre neuronas maduras e inmaduras en el giro dentado (GD) del hipocampo. Secciones coronales del GD en animales representativos de cada grupo mostrando células NeuN-ir (A-C) y células DCX-ir (D-F). No se observaron diferencias en el IRA de NeuN (G). Obsérvese la disminución de células DCX-ir generada por STZ, que se recuperó con el tratamiento con IGF1 (H). Barra de escala: 20 μ m (C, F). Abreviaturas: GCL: capa celular granular; ML: capa molecular. Los datos se analizaron mediante ANOVA de un factor y se representaron como media \pm SEM. * p < 0,05; ** p < 0,01.

Basándonos en nuestros hallazgos conductuales e histológicos, nos preguntamos si la transferencia del gen IGF1 podría actuar sobre la función sináptica. Por lo tanto, analizamos mediante WB varias proteínas relevantes para la función sináptica del hipocampo. Inicialmente registramos en los animales con STZ una disminución de la proteína de densidad postsináptica 95 (PSD95), la proteína de andamiaje más abundante en las densidades postsinápticas. De manera interesante, los niveles de esta proteína se restablecieron con la transferencia del gen IGF1 (**Fig. 37A**) (ANOVA de un factor, $F_{(2,18)} = 4,964$, $p = 0,0192$). Para estudiar la transferencia de vesículas sinápticas, analizamos la expresión de SYT2 y de la proteína de la vesícula sináptica 2 (SV2). Mientras que los niveles de SV2 no se alteraron en los grupos STZ e IGF1 (**Fig. 37B**) (ANOVA de un factor, SV2: $F_{(2,18)} = 2,547$, $p = 0,1061$), SYT2 disminuyó significativamente en los animales con STZ, una alteración que se observó en igual medida en los animales con IGF1 (**Fig. 37C**) (ANOVA de un factor, SYT2: $F_{(2,18)} = 4,043$, $p = 0,0355$). Por último, evaluamos los niveles de glutamato descarboxilasa (GAD65/67), la enzima que produce el neurotransmisor GABA. Registramos una tendencia sin una disminución significativa de esta proteína en los animales con STZ. Por el contrario, las ratas tratadas con IGF1 sí mostraron un aumento significativo en comparación con el grupo STZ (**Fig. 37C**) (ANOVA de un factor, $F_{(2,18)} = 4.845$, $p = 0,0207$). En conclusión, la STZ provoca una disminución de los niveles de proteínas sinápticas y nuestros resultados muestran que la transferencia del gen IGF1 podría mejorar la función cognitiva en este modelo al restaurar la función neuronal y sináptica.

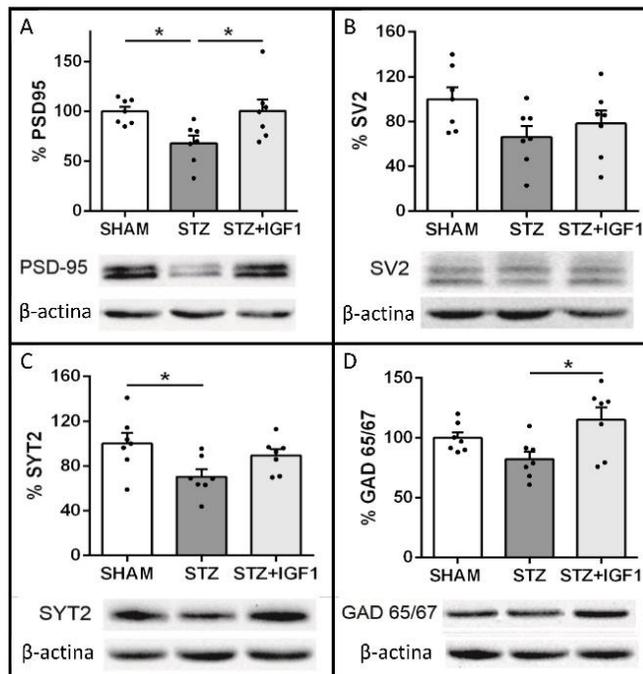


Figura 37: Efecto de la transferencia génica de IGF1 en los niveles de proteínas sinápticas del hipocampo. Cuantificación de los niveles proteicos de la proteína de densidad postsináptica 95 (PSD95) (A), proteína de vesícula sináptica 2 (SV2) (B), sinaptotagmina 2 (SYT2) (C), y ácido glutámico descarboxilasa 65/67 (GAD65/67) (D), normalizados respecto a la densidad relativa

de β -actina. Se observó una disminución significativa de los niveles de proteína PSD95 y SYT2 en el grupo STZ, mientras que el tratamiento con IGF1 produjo un aumento de los niveles de PSD95 y GAD65/67. Los datos se analizaron mediante ANOVA de un factor y se representaron como media \pm SEM. * $p < 0,05$.

5.2.5 Correlación entre el comportamiento y los niveles de proteínas neuronales del hipocampo

Realizamos un análisis de correlación de Pearson entre los parámetros de comportamiento y las proteínas neuronales del hipocampo, ya sea por IHC o WB (**Fig. 38**). Las células DCX-ir se correlacionaron positivamente con las canicas enterradas ($p = 0,0003$), y negativamente con la latencia del RO ($p = 0,010$), y la latencia ($p = 0,016$) y los errores ($p = 0,042$) del PT en el LB. Por otro lado, sólo se encontró una correlación marginal contra la inmovilidad en el NF ($p = 0,059$).

El IRA de NeuN sólo se correlacionó negativamente con la latencia RO y los errores de PT de LB ($p = 0,045$ y $p < 0,001$, respectivamente). Por otro lado, la relación pTau/Tau no se correlacionó con la cantidad de canicas enterradas, pero mostró una correlación significativamente positiva con la latencia del RO, la latencia y los errores del PT en el LB, y la inmovilidad de la NF ($p < 0,0001$, $p = 0,021$, $p < 0,001$, y $p = 0,008$, respectivamente). La expresión de PSD95 del hipocampo se correlacionó positivamente con las canicas enterradas ($p = 0,035$) y negativamente con la inmovilidad del NF ($p = 0,044$). Se encontró un patrón similar para la expresión de SV2, excepto que no se correlacionó con la inmovilidad ($p = 0,029$ para canicas enterradas). En esta misma línea, observamos una correlación significativa entre SYT2 y el enterramiento en el MB ($p = 0,032$). Adicionalmente, GAD65/67 no se correlacionó con los resultados del MB, pero sí lo hizo negativamente con la latencia RO y la inmovilidad en el NF ($p = 0,004$ y $p = 0,033$, respectivamente).

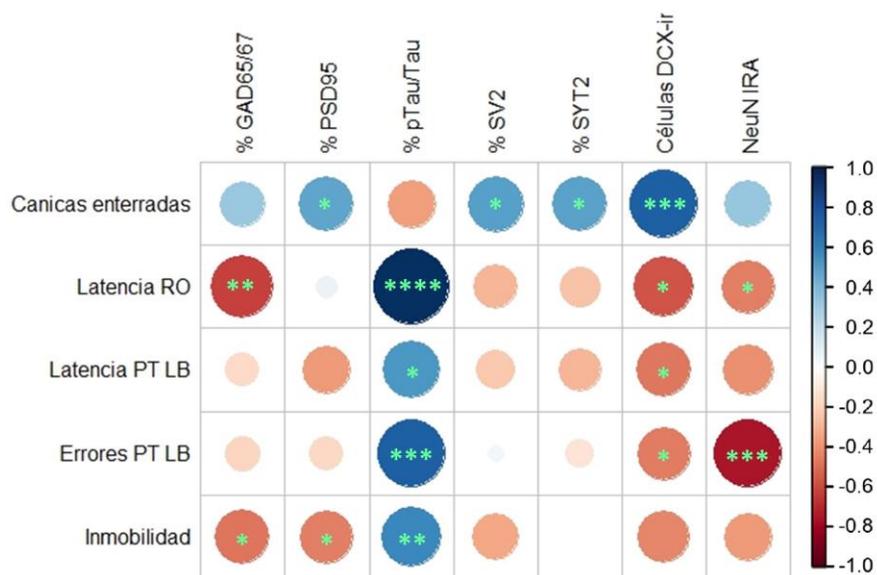


Figura 38: Correlación entre comportamiento y función neuronal. La matriz de correlación muestra las intrincadas asociaciones entre los niveles de proteínas neuronales y el comportamiento animal. La significancia estadística (p-valor) para el coeficiente de correlación de Pearson fue incluida. * $p < .05$; ** $p < .01$; *** $p < .001$; **** $p < .0001$.

5.3 Discusión del experimento de terapia génica con IGF1

Tras el desarrollo de la EA, no existe ningún tratamiento farmacológico que detenga su progresión irreversible. En este sentido, los factores tróficos se han considerado agentes prometedores desde hace décadas para prevenir o recuperar la muerte de las neuronas, aunque algunos experimentos resultaron controversiales (Gubbi et al., 2018). Sin embargo, líneas de evidencia que muestran mejoras destacadas en modelos de EA, nos impulsaron a realizar el presente estudio. Por ejemplo, se demostró que la aplicación intranasal de insulina (Y. Chen et al., 2018; Freiherr et al., 2013; Guo et al., 2017), y una fracción enriquecida con factores tróficos de plasma humano (Anitua et al., 2013), mejoró el comportamiento y la plasticidad sináptica en modelos de EA. Por otro lado, se reportó que el IGF1, un potente péptido neuroprotector, promueve la supervivencia de las neuronas y reduce la neuroinflamación (Doré et al., 1997; Ebert et al., 2008; Falomir-Lockhart et al., 2022). Anteriormente integrantes de nuestro grupo realizaron terapia génica con IGF1 icv en el cerebro de ratas seniles. Este enfoque mejoró la memoria espacial que se encuentra deteriorada por la avanzada edad de los animales, aumentó las neuronas inmaduras del GD, y tuvo un impacto en el transcriptoma del hipocampo mediante la modulación de proteínas de unión a IGF1, integrinas y proteínas sinápticas, entre otros genes (Pardo et al., 2016, 2018).

Nuestra hipótesis es que este paradigma de transferencia de genes de factores neurotróficos mejora el comportamiento y la función sináptica en el modelo de EAe con inyección de STZ-icv. Nuestros hallazgos indican que el principal logro del enfoque de transferencia del gen IGF1 ha sido la recuperación manifiesta, parcial e incluso total en algunos casos, en las tareas relacionadas con la memoria de reconocimiento y espacial, el enterramiento de canicas y el comportamiento similar a la depresión. En línea con nuestro trabajo, en un estudio reciente realizado en colaboración, inyectamos el mismo vector RAd-IGF1 en un modelo de EA generado en ratón mediante inyección icv de oligómeros β A, logrando una mejora en el rendimiento cognitivo (Selles et al., 2020).

En nuestro experimento, observamos que la población de NeuN del GD disminuyó tras la inyección de STZ, y que la transferencia del gen IGF1 mostró una tendencia a recuperarla, aunque estos cambios no llegaron a ser significativos. Sin embargo, registramos una correlación significativamente negativa entre el IRA NeuN y la latencia RO y los errores del LB. Al mismo tiempo encontramos que la población de DCX del GD también se vio fuertemente disminuida tras la inyección de STZ y, en este caso, se recuperó completamente tras la transferencia del gen IGF1. Curiosamente, excepto para los resultados del NF, el recuento de DCX se correlacionó positivamente con los parámetros de respuesta de todas las demás pruebas de comportamiento. Por lo tanto, nuestros datos sugieren que las neuronas inmaduras del hipocampo desempeñan un papel más destacado en el comportamiento que las células granulares maduras del GD, y que la recuperación de DCX mediada por IGF1 tiene un impacto directo en el rendimiento comportamental en el contexto de EAe. Anteriormente, se demostró que algunos comportamientos típicos de la especie, como enterrar canicas, se ven afectados por el daño en el hipocampo (Deacon & Rawlins, 2005).

La EA está marcada por la hiperfosforilación de Tau en el cerebro. No sólo registramos una relación pTau/Tau aumentada tras la inyección de STZ que se revirtió con la transferencia del gen IGF1, sino que también encontramos que la relación pTau/Tau estaba positivamente correlacionada con la latencia y los errores del LB, la latencia RO y la inmovilidad en el NF. Nuestros resultados sugieren que la fosforilación aumentada de Tau podría ser en el modelo STZ-icv, un predictor fiable de un mal rendimiento en los test

de LB, RO y NF. Este no es el caso de DCX, que no se relaciona con la inmovilidad del NF. Esto concuerda con el paradigma aceptado de que la neurogénesis adulta está implicada en tareas relacionadas con la memoria, pero no en la condición depresiva, como se evidencia en el NF, que depende de otras regiones cerebrales (Slattery et al., 2011).

El IGF1 activa el receptor de la insulina y su propio receptor, el IGF1R, compuesto por subunidades α extracelulares y β intracelulares. En un modelo de rata similar, generado con tres inyecciones de STZ a menor dosis que la utilizada por nuestro grupo, el ARNm del IGF1R se encontró diferencialmente disminuido en el tejido de la corteza y el estriado de las ratas con STZ (Grünblatt et al., 2004). Esto plantea la hipótesis de que, a través de la disminución de expresión de este receptor en el cerebro, la STZ repercute en las respuestas celulares para la señalización del crecimiento y la supervivencia, aumentando la vulnerabilidad a muerte celular. De hecho, en este modelo también se ha observado una disminución de la densidad de los IR (Agrawal et al., 2011; Grünblatt et al., 2007; Salkovic-Petrisic et al., 2006). Sin embargo, en un estudio sobre muestras *post-mortem* de la corteza frontal de pacientes con EA, no se encontraron diferencias significativas en la densidad del IGF1R evaluadas por autorradiografía cuantitativa (Keyser et al., 1994). En nuestro trabajo, encontramos niveles similares de IGF1R β entre los tres grupos experimentales. En un interesante estudio en el que se comparan los niveles de esta subunidad del receptor en los modelos de EA en ratón tratado con STZ y 3xTg-AD transgénicos (Y. Chen et al., 2013), no se observaron diferencias en los animales inyectados con STZ mientras que en los transgénicos se evidenció una disminución significativa. En línea con esto, en otro estudio, no se observaron diferencias significativas en p-IR β ni en p-IGF1R β en el hipocampo de ratas inyectadas unilateralmente con STZ (Guo et al., 2017). Además, nuestro trabajo reveló que los niveles de IGF1R α en el hipocampo del grupo STZ se encontraba significativamente por encima de la línea de base del control, que a su vez aumentó tras el tratamiento con IGF1. Un estudio colaborativo sobre muestras de hipocampo humano con EA (Selles et al., 2020), reveló que, mientras que el IGF1 activo (no unido a sus proteínas de unión y transporte) se encontró disminuido, la inmunorreactividad de la subunidad α del IGF1R aumentó en las muestras de EA, lo que sugiere que es una compensación del deterioro de la señalización de IGF1 en la enfermedad. Sin embargo, en este mismo estudio, no se encontraron diferencias significativas entre los ratones transgénicos APP/PS1 y sus homólogos de tipo salvaje. Por último, en el mismo trabajo, los niveles de IGF1R α estaban disminuidos en el modelo generado con oligómeros β A inyectados icv (Selles et al., 2020). Curiosamente, en estos dos modelos de ratón se produjo una disminución de IGF1 activo. En relación con esto, en un trabajo anterior de nuestro grupo con terapia con RAd-IGF1, se registraron cambios en la expresión de las proteínas de unión a IGF1, específicamente una regulación a la baja de IGFbp4 y una regulación al alza de IGFbp6 en el hipocampo de rata senil (Pardo et al., 2018). Las diferencias en los resultados sobre la expresión del IGF1R en los modelos de EA podrían estar relacionadas con la naturaleza de los modelos, los tiempos de evaluación, los métodos de detección, o una combinación de estos factores. Por ahora no se encuentran estudios en modelos animales de EA en los que se hayan evaluado ambas subunidades del IGF1R. En el presente trabajo, observamos que la diferencia significativa evidenciada para IGF1R α está en línea con la tendencia de nivel para la subunidad β .

Por otro lado, algunas pruebas experimentales sobre el papel del IGF1 en la EA son controvertidas. Así, se ha sugerido que el IGF1 puede promover la patología de la EA. Por ejemplo, los ratones transgénicos APP/PS1 mostraron una patología menos grave al cruzarse con ratones enanos IGF1^{-/-} (Puig et al., 2016; Sohrabi et al., 2020). En consecuencia, la intrincada relación entre la señalización de IGF1, la disponibilidad

de su receptor y la EA justifica una mayor investigación. Los efectos del IGF1 parecen ser altamente dependientes de estado general del cerebro y del contexto en el que se lo evalúa (Gubbi et al., 2018).

En cuanto a la microglía, hemos observado que el tratamiento con IGF1 aumentó su número en el hipocampo, lo cual va en línea con sus efectos esperados en relación al aumento de la supervivencia y proliferación celular, tal como se describió en la **sección 1.4.1.2** de la introducción.

Por otro lado, se ha documentado un aumento de la reactividad microglial en el estriado de ratas tras la administración icv de RAd-IGF1, en comparación al grupo inyectado con un vector RAd control (Falomir-Lockhart et al., 2019). Esto está en línea con nuestra observación de aumento de reactividad de la población microglial del hipocampo. La respuesta inmunitaria exacerbada ejercida por la microglía y los astrocitos en EA está caracterizada por una fuerte expresión de la enzima iNOS. Esta proteína se expresa en la microglía reactiva, los astrocitos y los macrófagos (Jana et al., 2005; Jaramillo et al., 2003; X. Lu et al., 2010; Sheng et al., 2011). Así, en un modelo de ratón transgénico de EA, la deficiencia genética de iNOS protegió a los ratones de la formación de placas seniles y del aumento de la reactividad astrogliar y microglial (Nathan et al., 2005). En nuestro estudio, encontramos que la STZ provocó un aumento de la iNOS hipocampal, mientras que el IGF1 la amortiguó hasta niveles no significativamente diferentes a los del grupo Sham, lo que sugiere que el IGF1 promueve una respuesta antiinflamatoria mediada por la microglía. Efectivamente, el mismo vector RAd-IGF1 inyectado en icv en ratas viejas promovió un aumento de la microglía con fenotipo antiinflamatorio en la unidad caudado-putamen, asociada con una mejora en la performance motora de las ratas (Falomir-Lockhart et al., 2022).

El óxido nítrico, a pesar de ser un relevante mediador biológico, desempeña un papel citotóxico a altas concentraciones. Así, esta molécula reacciona con el anión superóxido, generando peroxinitrito, una especie altamente reactiva y tóxica que puede inducir peroxidación de lípidos y daño oxidativo de proteínas (Szabó et al., 2007; Yuste et al., 2015). Además de la nitración, el óxido nítrico y las especies relacionadas están implicados en un tipo de modificación postraducciona, la S-nitrosilación. Por lo tanto, un desequilibrio de estas especies reactivas puede dar lugar a modificaciones aberrantes y efectos en las células cerebrales (Nakamura & Lipton, 2011; Zhao et al., 2015). En un interesante estudio con ratones transgénicos que sobreexpresan APP se observaron mayores niveles de iNOS y nNOS en la corteza cerebral (Zaręba-Kozioł et al., 2014), junto con una mayor cantidad de proteínas S-nitrosiladas (S-NO), detectadas en la fracción de sinaptosomas. Se sugirió que este fenómeno estaba causado por un exceso de óxido nítrico. Por lo tanto, debido al aumento de expresión de iNOS, es posible que diversas proteínas se encuentren alteradas por S-nitrosilación en el grupo STZ. Curiosamente, la S-nitrosilación de PSD95 supera a la palmitoilación en los mismos residuos, lo que impide su tráfico a la densidad postsináptica, donde PSD95 se ensambla con nNOS y el receptor de NMDA. En nuestro estudio, observamos que la transferencia del gen IGF1 restablece los niveles de PSD95. Por otro lado, un trabajo demostró que concentraciones altas y neurotóxicas de óxido nítrico, situación que hipotetizamos ocurre en el grupo STZ, S-nitrosilan a Akt, inhibiendo directamente su acción neuroprotectora (Numajiri et al., 2011).

Existen pruebas sustanciales de que la inyección de STZ afecta a las proteínas sinápticas del hipocampo. En dos estudios, ratas inyectadas con STZ mostraron una disminución de PSD95 en el hipocampo (M. A. Fox & Sanes, 2007; Rajasekar et al., 2017). En un trabajo independiente, se inyectó STZ icv en ratas y tanto SYP como PSD95 disminuyeron en el hipocampo (Li et al., 2020). En nuestro trabajo, encontramos una reducción de PSD95 después de la inyección de STZ, que fue significativamente restaurada por el tratamiento.

Como hemos documentado anteriormente, la inyección de STZ provoca una disminución de SYT2 y GAD65/67 (Zappa Villar et al., 2020). En este estudio, observamos una tendencia de restauración de SYT2 tras la transferencia del gen IGF1, dado que el grupo STZ+IGF1 no mostró dicha disminución, por lo que no fue significativamente diferente del control Sham. En cuanto a GAD65/67, la disminución tras la inyección de STZ no alcanzó a ser significativa estadísticamente, aunque encontramos esta enzima aumentada después del tratamiento con IGF1. La discrepancia con nuestros resultados anteriores puede deberse a las diferencias de elección de tiempo post inyección para realizar los análisis, que en nuestro trabajo previo fue de 3 meses después de la STZ. Esto plantea la posibilidad de que la enzima GAD65/67 se vea afectada más tarde en el tiempo en este modelo, aunque la mejora de IGF1 puede seguir siendo beneficiosa para la función sináptica y el comportamiento. Por otra parte, los niveles de SV2, una proteína presináptica que ya habíamos documentado encontrarse disminuía después de la inyección de STZ, no tuvieron diferencias significativas entre los tres grupos evaluados, pero sí lo fue al realizar una comparación de prueba t por pares entre grupo control y STZ ($p= 0,039$). Sin embargo, los niveles de SV2 no fueron modificados por el tratamiento con IGF1.

Previamente nuestro grupo demostró que tras la administración icv, el vector RAd-IGF1 transduce las células ependimarias que recubren los ventrículos laterales (Hereñú et al., 2009; Pardo et al., 2016, 2018). Estas células sobreexpresan IGF1 al menos de 2 a 20 días después de la inyección (Hereñú et al., 2009), siendo secretado al LCR, desde donde impacta a diferentes estructuras cerebrales, como el hipocampo. Proponemos que el efecto terapéutico del IGF1 en este estudio se basó en la mejora de la señalización de la cascada del IGF1 en las neuronas, lo que provocó una disminución de pTau, y recuperó la expresión de proteínas sinápticas y de neuronas inmaduras positivas para DCX. A su vez, proponemos que el IGF1 impacta en la microglía y modula esta población hacia un fenotipo reactivo antiinflamatorio, lo que contribuye a un ciclo virtuoso que conduce a una mejora del comportamiento en este modelo de EAe. Por lo tanto, la sobreexpresión de IGF1 en el cerebro tiene un impacto beneficioso contra la patología de la EA, restaurando y previniendo daños mayores.

5.4 Resultados de terapia génica con timulina

5.4.1 La terapia con timulina disminuyó la ansiedad y mejoró parcialmente los comportamientos típico de especie, exploratorio y símil depresión.

A través del test de MB, encontramos que el enterramiento de canicas típico de los roedores, se encontraba afectado a los 3 meses después de la inyección de STZ, es decir, los animales del grupo STZ enterraron una menor cantidad de canicas respecto de los animales control. Esta disminución no fue significativa en los animales STZ+FTS por lo que la terapia génica con timulina tendió a mejorar este tipo de comportamiento (**Fig. 39A**) (ANOVA de un factor de datos transformados logarítmicamente, $F_{(2, 21)}=5,948$, $p=0,0090$).

Para evaluar el comportamiento ansioso y exploratorio, observamos y cuantificamos la performance de las ratas en el test de CA. El grupo STZ exploró menos el ambiente, evidenciado por una disminución significativa en el número de líneas cruzadas en la caja (*crossing*), y la terapia mostró una tendencia de incremento del comportamiento exploratorio pues no se observaron diferencias significativas respecto al control aunque no llegó a ser significativo respecto al grupo STZ (**Fig. 39E**) (ANOVA de un factor, $F_{(2, 21)}=3,910$, $p=0,0360$). En cuanto a la exploración vertical (*rearing*), no hubo diferencias entre los tres grupos (**Fig. 39F**). Por otro lado, nuestros resultados sugieren que la terapia con timulina tiene potencial para disminuir el comportamiento ansioso ya que aminoró el tiempo de *grooming* de los animales, comparado con el grupo STZ (**Fig. 39G**) (ANOVA de un factor, $F_{(2, 21)}=3,694$, $p=0,0422$).

Para evaluar el comportamiento símil depresión, cuantificamos el tiempo de flote durante el NF. Los animales STZ mostraron un aumento significativo en este parámetro, el cual tendió a reducirse pero no pudo ser normalizado por la terapia génica con timulina dado (**Fig. 39H**) (ANOVA de un factor, $F_{(2, 21)}=4,001$, $p=0,0337$).

Concluimos que la terapia con timulina mejoró el comportamiento de los animales, aunque no pudo revertir completamente las alteraciones del comportamiento típico de especie, exploratorio y símil depresión afectado por la STZ-icv. En el caso de la ansiedad, medida por el tiempo de *grooming*, la terapia fue efectiva en disminuirla.

5.4.2 La terapia con timulina restauró la memoria de reconocimiento pero no la memoria espacial

Para evaluar la memoria de reconocimiento a corto y largo plazo (90 min y 24 hs, respectivamente), realizamos los test RO2 y RO3. Cuando las ratas fueron expuestas a los dos objetos idénticos durante el RO1, a través del I.D. no se detectó preferencia por ninguno de ellos (datos no mostrados). Tanto en el RO2 como en el RO3, mientras que los animales control mostraron una buena performance, recordando el objeto familiar y, consecuentemente, explorando más el objeto nuevo (I.D. >0), el grupo STZ no discriminó entre el objeto familiar y el novedoso (I.D. no distinto de 0). La terapia génica con timulina restauró este tipo de memoria tanto a corto plazo (**Fig. 40A**) (RO2, t-test para una media: Sham: $p=0,0023$; STZ: $p=0,4329$; STZ+FTS: $p=0,0394$), como a largo plazo (**Fig. 40B**) (RO3, t-test para una media: Sham: $p=0,0101$; STZ: $p=0,2320$; STZ+FTS: $p=0,0489$).

Por otro lado, para evaluar si la terapia génica tuvo repercusiones en la memoria espacial, realizamos el LB. Si bien durante los repetidos ensayos de adquisición de memoria (AT), todos los animales aprendieron la tarea de ubicar la caja de escape (medida en el tiempo de latencia), el grupo STZ tuvo una curva de

aprendizaje que se mantuvo por encima de la curva del grupo Sham (**Fig. 40C**), mientras que el grupo tratado con timulina se comportó de manera más similar al control. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre los grupos en latencia. Por lo tanto, la terapia con timulina tiene un efecto diferencial en la memoria de los animales, mostrando potencial para recuperar el deterioro en la memoria de reconocimiento, no así con la memoria espacial.

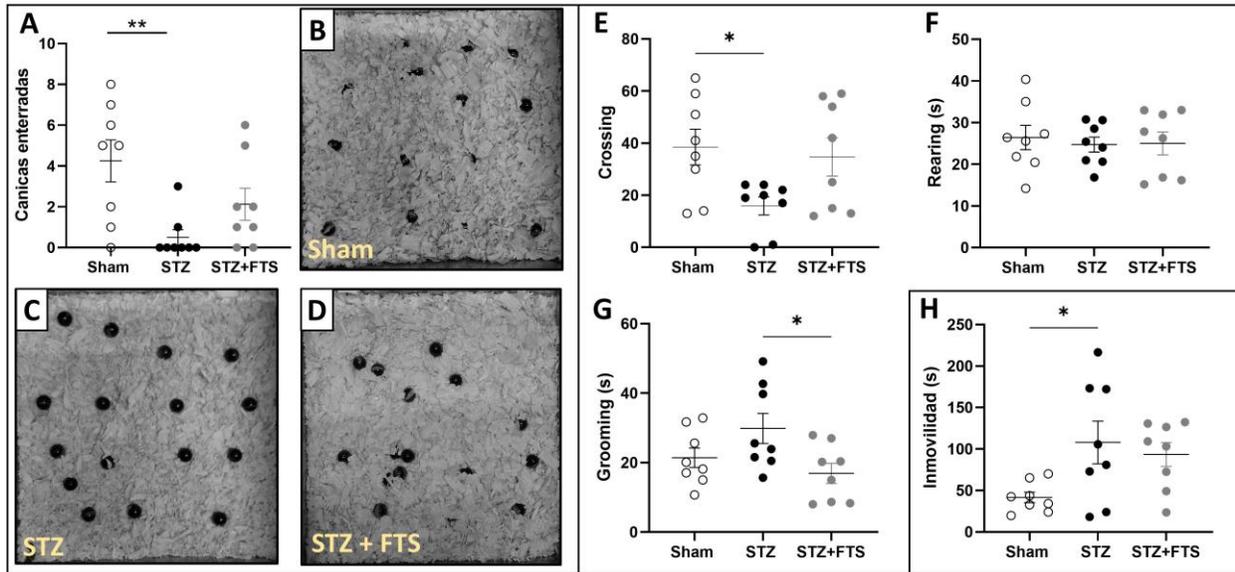


Figura 39: La transferencia génica de timulina modificó el comportamiento típico de especie, exploratorio y símil depresión afectado por la STZ-icv. Disminución del enterramiento de canicas por la STZ-icv en el test de MB (A) y fotos representativas del resultado del test para cada grupo experimental (B-D). La exploración en el CA mostró disminución del *crossing* (E) pero no del *rearing* (F) luego de la inyección de STZ-icv; no se observó esta disminución del *crossing* en los animales con timulina. Disminución significativa del *grooming* en el CA por la terapia, con respecto al grupo STZ (G). Aumento del comportamiento símil depresión dado por la inyección de STZ, sin efecto significativo de la terapia (H). Los datos se analizaron mediante ANOVA de un factor y se representaron como media \pm SEM. *p < 0,05; **p < 0,01.

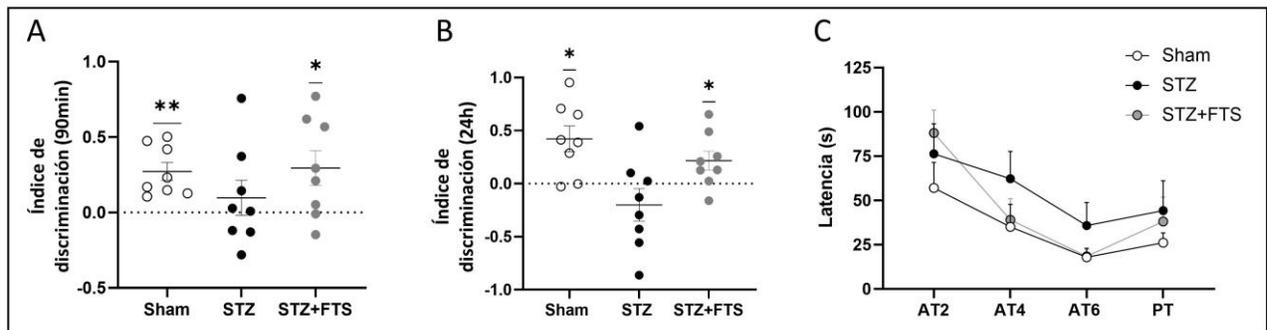


Figura 40: Recuperación de la memoria de reconocimiento, pero no de la memoria espacial por transferencia génica con timulina. La transferencia génica de timulina recuperó la memoria de reconocimiento (índice de discriminación significativamente distinto y mayor a 0) que la STZ afecta tanto a corto plazo (A) como a largo plazo (B). Sin embargo, la timulina no mejoró la memoria de espacial evaluado por el LB (C). Las comparaciones se hicieron contrastando el índice de discriminación con el nivel de azar 0 (t-test de una muestra) (A y B), mediante un ANOVA de dos factores con medidas repetidas (C). Todos los datos se representaron como media \pm SEM. *p < 0,05; **p < 0,01.

5.4.3 La terapia con timulina no recuperó las neuronas inmaduras en el giro dentado

El número de neuronas inmaduras fue cuantificado en la zona neurogénica del hipocampo, es decir, la SGZ del GD, siendo identificadas como células DCX-ir. Observamos una marcada disminución de las neuronas inmaduras en el grupo STZ con respecto al control, que no pudo ser revertido por la terapia con timulina (**Fig. 41A**) (ANOVA de un factor, $F_{(2, 21)} = 34,58$, $p < 0,0001$).

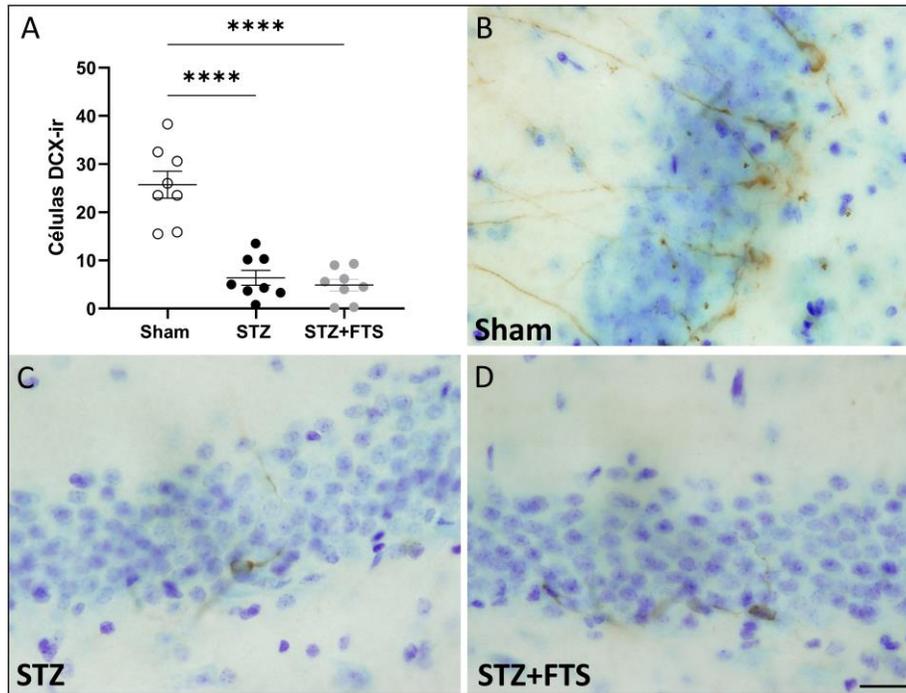


Figura 41: La transferencia génica de timulina no reestableció las neuronas inmaduras en el GD afectadas por STZ-icv. La cuantificación de células DCX-ir mostró una fuerte reducción en su número por la inyección con STZ, que no pudo ser recuperada por el tratamiento con timulina (**A**). Cortes coronales de la capa celular granular (en azul) y SGZ del GD, representativas de cada grupo experimental (**B-C**). Barra de escala: 20 μm. Los datos se analizaron mediante ANOVA de un factor y se representaron como media ± SEM. ****p < 0,0001.

5.4.4 Efecto inmunomodulador de la terapia con timulina en las células gliales del hipocampo

5.4.4.1 Microglía

Para evaluar si la terapia génica con timulina moduló la población microglial, se cuantificó el número de células Iba-ir y se las clasificó según su morfología en reactivas o no reactivas, en el GD. Observamos un aumento significativo del número de células Iba1⁺ en el grupo STZ respecto al Sham. El grupo que recibió la timulina no difirió significativamente respecto al Sham, sin embargo, la terapia no reestableció la cantidad de células microgliales a niveles normales (**Fig. 42A**) (ANOVA de un factor, $F_{(2, 21)} = 3,523$, $p = 0,0479$). De manera interesante, la timulina produjo una disminución muy marcada de la reactividad de la microglía (que mostró una tendencia a aumentar por la inyección con STZ [$p = 0,0591$]), disminuyendo el porcentaje de células con morfología reactiva incluso por debajo del grupo control (**Fig. 42B**) (ANOVA de un factor, $F_{(2, 21)} = 12,91$, $p = 0,0002$). Por lo tanto, nuestros resultados muestran que la timulina tiene un fuerte potencial para modular el fenotipo microglial.

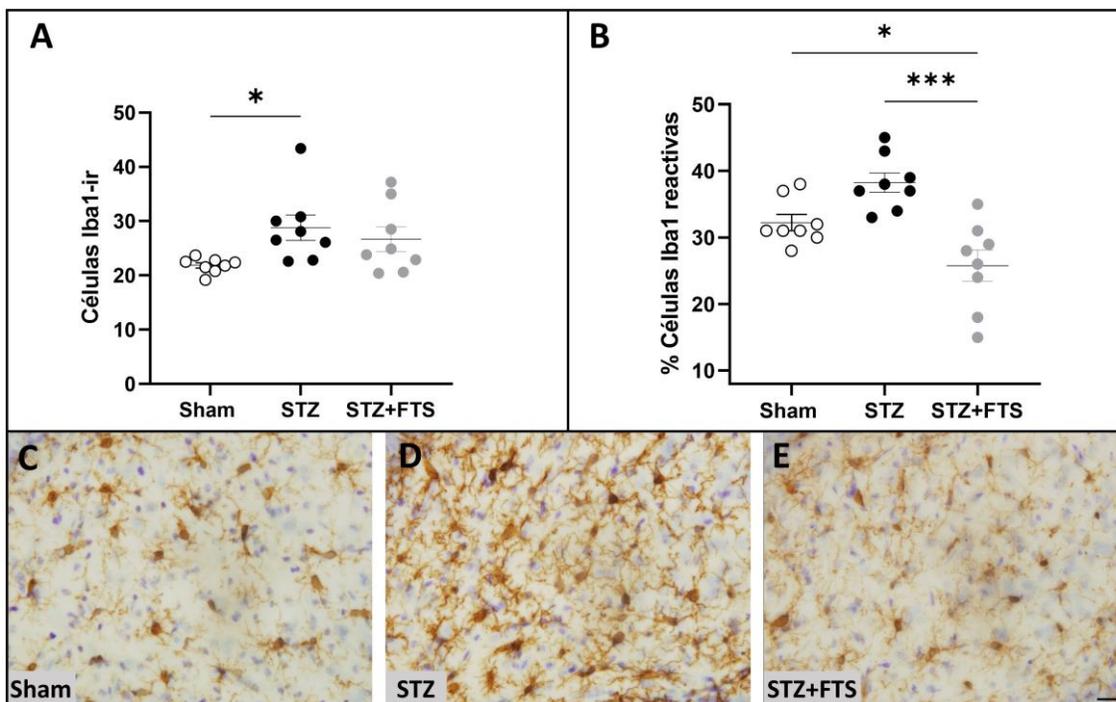


Figura 42: La transferencia génica de timulina disminuye la reactividad de la microglía en el giro dentado. La cuantificación de células Iba1-ir mostró un aumento del número de microglía inducido por la STZ, y una tendencia a reducirlo por la timulina(A). La timulina disminuyó significativamente los niveles de microglía con morfología reactiva, hasta niveles más bajos que los animales control (B). Cortes coronales del Hilus del GD inmunomarcados contra Iba1, imágenes representativas de cada grupo experimental (C-E) Barra de escala: 20 μ m. Los datos se analizaron mediante ANOVA de un factor y se representaron como media \pm SEM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,0001$.

5.4.4.2 Astrocitos

Decidimos enfocar nuestro análisis en la región de CA3, donde previamente documentamos cambios inducidos por la STZ en los astrocitos. Nuestros resultados muestran que la timulina incrementó el IRA por encima de los niveles del control Sham y del grupo STZ (**Fig. 43A**) (ANOVA de un factor, $F_{(2, 21)}=13,85$, $p=0,0001$). Si bien el análisis estadístico de los tres grupos experimentales no mostró diferencias significativas entre los grupos Sham y STZ, al realizar un t-test de Student, se observó un incremento en el IRA por STZ ($p=0,0154$). Por otro lado, mediante el análisis de Sholl, no se encontraron diferencias significativas en la complejidad de ramificación de los astrocitos (**Fig. 43B**). Finalmente, en cuanto al número de células GFAP-ir, observamos que el tratamiento con timulina incrementó el número de células, comparado al grupo control y al grupo con STZ (**Fig. 43C**) (ANOVA de un factor, $F_{(2, 21)}=6,348$, $p=0,007$).

5.5 Discusión del experimento de terapia génica con timulina

La EA está caracterizada por un incremento en la reactividad de la microglía y de los astrocitos, que es un reflejo de cambios moleculares, bioquímicos y transcripcionales de estas células, en respuesta a un estímulo patológico. Por ende, las múltiples funciones en la que se ven involucradas resultan desreguladas en este contexto. Estos cambios pueden mantenerse mientras que el estímulo patológico está presente, mientras que otros aspectos pueden resolverse, mostrando que la reactividad de las células gliales puede

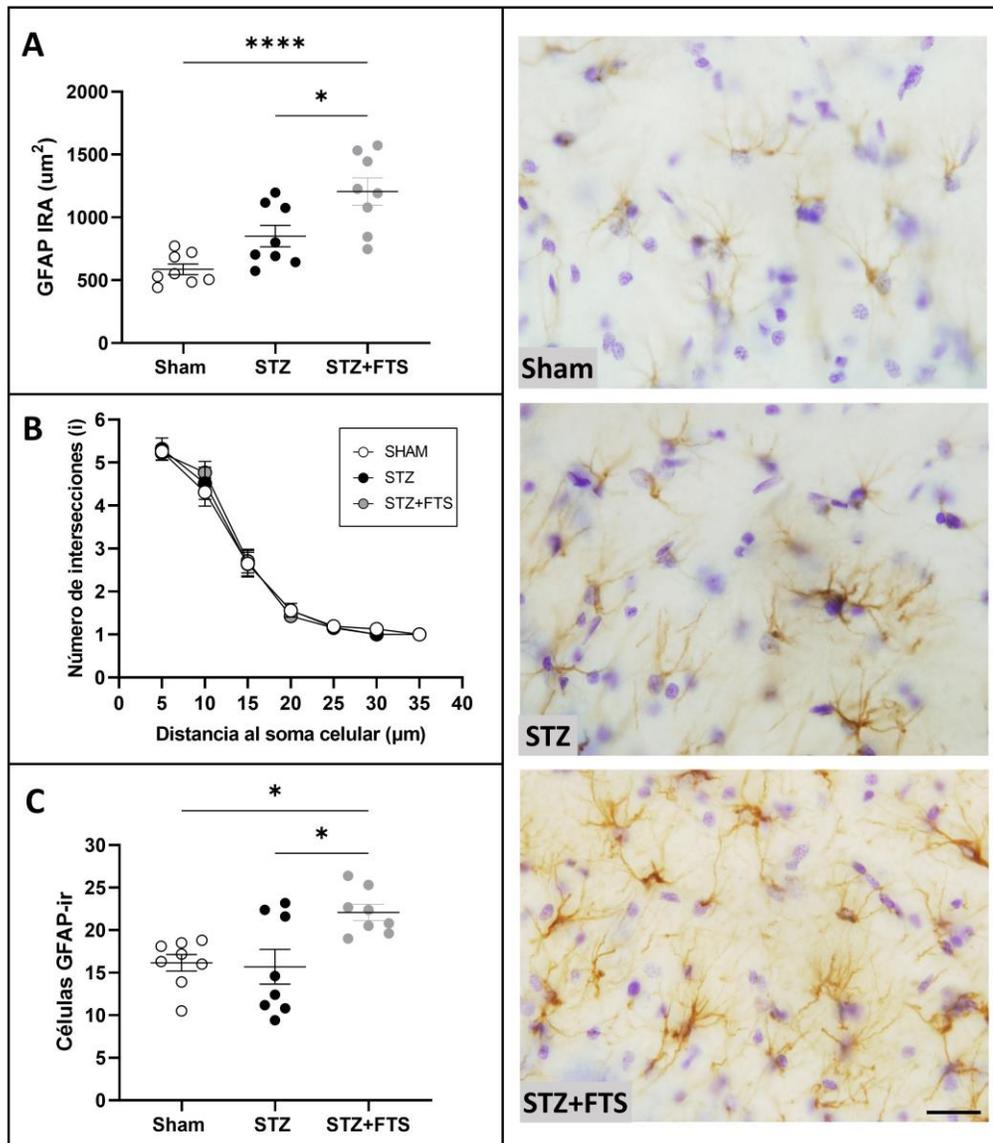


Figura 43: La transferencia génica de timulina aumenta el área inmunorreactiva (IRA) de GFAP en los astrocitos en el hipocampo. El tratamiento con timulina incrementó la expresión de GFAP en la región de CA3 del hipocampo (A). No se observaron diferencias en la arborización de las células, estudiada mediante el análisis de Sholl (B), pero sí en el número de células GFAP-ir, aumentado en el grupo con la terapia (C). Cortes coronales de CA3 inmunomarcados contra GFAP, imágenes representativas de cada grupo experimental (D-F). Barra de escala: 20 µm. Los datos se analizaron mediante ANOVA de un factor y se representaron como media ± SEM. * $p < 0,05$; **** $p < 0,0001$

ser un proceso reversible (Escartin et al., 2019). A pesar de los resultados prometedores que obtuvimos con la terapia génica con IGF1, nos encontrábamos interesados en encontrar una estrategia que nos permita modular la reactividad de la microglía y los astrocitos, inducida por la STZ. La timulina es un nonapéptido del cual se ha demostrado posee propiedades antiinflamatorias en diversos modelos murinos caracterizados por una importante inflamación, como en el modelo experimental de fibrosis pulmonar (Yara et al., 2001), el modelo de inflamación crónica por inyecciones periféricas (Novoselova et

al., 2018), o centrales (Safieh-Garabedian et al., 2003, 2011) de LPS, y el modelo de asma alérgica (Da Silva et al., 2014).

Previamente, nuestro grupo reportó que una única inyección im del vector RAd-FTS basta para mantener los niveles de timulina aumentados en el suero de rata hasta más de 100 días post inyección (Morel et al., 2006), por lo que decidimos usar esta estrategia en el modelo de STZ-icv para un experimento de terapia a mediano plazo, específicamente a tres meses post inyección. Este es el primer trabajo en el que se evalúa el efecto de la timulina en un modelo de enfermedad neurodegenerativa.

A diferencia de la terapia con IGF1, nuestros resultados de enterramiento típico de especie, exploración y comportamiento símil depresión, revelan que la timulina mejoró parcialmente la performance de los animales del modelo STZ-icv, mostrando un efecto más claro en la ansiedad, disminuyéndola en comparación con las ratas inyectadas con STZ. Además, la terapia con timulina restauró la memoria de reconocimiento de corto y largo plazo, aunque no tuvo efectos en la memoria espacial, lo que demuestra que estos dos tipos de memoria no se encuentran controladas por los mismos circuitos, a pesar de que comparten áreas cerebrales que las modulan. Las regiones importantes para la memoria espacial son el hipocampo con sus *place cells*, que proporcionan una representación estable de ubicación (O'Keefe & Conway, 1978), y la corteza entorrinal con sus "grid cells", que producen mapas de coordenadas internas que permiten al animal desplazarse de un lugar a otro (Hafting et al., 2005). Menos claro resulta el papel de la corteza prefrontal medial, que parece estar involucrada en la memoria espacial aunque bajo ciertas condiciones de testeo (de Bruin et al., 1994; Sang Jo et al., 2007). Sin embargo, para la memoria de reconocimiento, no existe un consenso claro sobre el rol de estas estructuras, aunque las tres parecen estar involucradas, como se detalló en la discusión del **Capítulo IV**. Esto implica que la diferencia selectiva que hemos observado en la mejora de la memoria podría estar relacionada al impacto de la timulina sobre diversos aspectos, como los circuitos neuronales involucrados, los neurotransmisores y sistemas de señalización, las interacciones gliales, y por último, la plasticidad sináptica, que es esencial para el almacenamiento y la recuperación de la memoria, y puede ser específica de regiones cerebrales o incluso subregiones dentro de una región determinada.

Todos los trabajos documentados hasta ahora que hacen uso de la timulina como agente terapéutico, han reportado únicamente sobre sus propiedades inmunomoduladoras en diversos modelos de inflamación aguda o crónica, mostrando su potencial de disminuir los mediadores inflamatorios circulantes tanto a nivel periférico como central (Da Silva et al., 2014; Kanaan et al., 2002; Novoselova et al., 2018; Safieh-Garabedian et al., 2002, 2011). En concordancia con estos resultados, nuestro trabajo indica que los aumentos de timulina sérica, son capaces de modular la respuesta microglial, específicamente disminuyendo su reactividad, en un modelo de EA. Este efecto pudo ser generado ya sea de forma directa, con la timulina ingresando al cerebro, o de forma indirecta, promoviendo cambios en las células inmunitarias periféricas que podrían generar una respuesta a nivel central, hipótesis para la cual resultaría interesante estudiar la integridad de la BHE en el modelo de STZ-icv. Aunque no contamos con pruebas de que la timulina pueda ingresar directamente al SNC, la Dra. Dardenne, una de las primeras personas en caracterizar este péptido y antigua colaboradora de nuestro grupo de investigación, comunicó a nuestro laboratorio que la timulina efectivamente puede ingresar al cerebro, como también fue comunicado en el artículo Safieh-Garabedian et al., 2003. Así, es posible que los efectos observados en nuestro experimento fueran el resultado del ingreso directo de la timulina al SNC.

Por otro lado, los resultados obtenidos sobre las neuronas inmaduras del giro dentado muestran claramente que la timulina no es un factor trófico como el IGF1, y que por lo tanto no tiene el potencial para recuperar la neurogénesis afectada por la STZ.

La astrogliosis reactiva es muy heterogénea, y por ejemplo se ha demostrado que, en esta reacción, a pesar de caracterizarse por la expresión alterada de un grupo central de genes, los astrocitos pueden presentar distintos genes diferencialmente expresados, según el estímulo o injuria aplicados (Zamanian et al., 2012). Los astrocitos reactivos son típicamente interpretados como detrimentales para el SNC, y aunque hay muchas pruebas de ello, actualmente se concibe que dependiendo del contexto, la reacción de estas células puede ser beneficiosa, como lo sugieren los resultados de Zamanian et al., 2012 con respecto a los astrocitos reactivos inducidos por isquemia, y como lo demuestran Abjean et al., 2023 en dos modelos murinos de enfermedad de Huntington. De manera inesperada, hemos observado que la timulina indujo un aumento de la expresión de GFAP y en el número de astrocitos. El incremento en el IRA de GFAP no fue consecuencia de un incremento en la arborización astrocitaria como lo demuestra el análisis de Sholl, sino del aumento en el número de astrocitos GFAP-ir. Sin embargo, cabe la posibilidad de que el incremento en el IRA de GFAP sea adicionalmente un reflejo de una hipertrofia celular, indicativo de reactividad astrocitaria. Si este fuera el caso y la timulina aumenta la reactividad astrocitaria, no podríamos asegurar que los astrocitos del grupo STZ+FTS se encuentren en el mismo estado reactivo que los astrocitos del grupo STZ. Por lo tanto resultaría interesante, al menos como primer paso, realizar un análisis de perfil transcriptómico, que sería útil para entender los cambios específicos inducidos tanto por la STZ como por la timulina. Teniendo en cuenta los resultados positivos de los test de comportamiento, hipotetizamos que la timulina promueve en los astrocitos funciones beneficiosas para las neuronas, como por ejemplo la expresión de factores que promuevan las sinapsis, hipótesis que resta por ser probada.

Con respecto al aumento del número de células GFAP-ir inducido por timulina, nos encontramos ante dos posibles escenarios. Una posible interpretación es que la timulina haya potenciado la proliferación de los astrocitos, y por otro lado, también es posible que dicho resultado sea consecuencia no de una activa división y diferenciación celular, sino de la expresión de GFAP por astrocitos que originalmente no expresaban esta proteína en niveles detectables, como se sugiere que ocurre en la EA (Serrano-Pozo et al., 2013).

Con estos resultados, hipotetizamos que el impacto de la timulina en la microglía y los astrocitos podría haber sido beneficioso para esta región, contribuyendo a la mejora del comportamiento ansioso y la recuperación de la memoria de reconocimiento. La discusión de nuestros resultados de comportamiento resulta limitada, ya que no existen otros trabajos que hayan evaluado el efecto de la terapia con timulina en el comportamiento de los animales, incluso en otro tipo de modelos. Sin embargo, estos resultados demuestran que la timulina puede tener un impacto beneficioso en comportamientos afectados en la EA, lo que justifica la realización de más estudios en esta temática.

5.6 Resultados del experimento de terapia celular con el secretoma de células madre mesenquimales

5.6.1 Comportamiento típico de especie y ansiedad

Previo a los test de comportamiento, el peso de los animales fue monitoreado periódicamente. El protocolo de instilación no afectó al peso de los animales durante todo el experimento, y se observó inicialmente la disminución del peso corporal típica post STZ, con posterior recuperación (datos no mostrados).

El test de MB es un test robusto para la evaluación del estado general del animal, ya que mide la actividad de enterramiento de las ratas macho, un comportamiento natural e inherente para estos animales. De esta forma, típicamente las ratas control entierran las canicas que encuentran sobre la viruta de sus cajas, mientras que los machos del modelo de STZ-icv, muestran una disminución significativa en este comportamiento típico de especie. En este experimento observamos que las ratas control se comportaron de forma atípica, al enterrar muy pocas canicas, de forma similar al grupo STZ (**Fig. 44A**) (ANOVA de un factor de datos transformados logarítmicamente; $F_{(3,25)} = 2,619$, $p = 0,0731$). Si bien en nuestro diseño experimental no existe un grupo experimental de ratas intactas, por experiencia previa y comparación con resultados previos de test con ratas de la misma edad, concluimos que es factible que el protocolo experimental de repetidas instilaciones afectó el comportamiento de enterramiento.

Por otro lado, en el test de CA mediante el cual analizamos exploración y ansiedad, encontramos que si bien hubieron diferencias de exploración entre los grupos Sham y STZ como es lo esperado, es decir los grupos tratados con STZ caminaron menos en la caja del test (**Fig. 44B**) (ANOVA de un factor; $F_{(3,25)} = 6,725$; $p = 0,0018$), todos los grupos se mostraron más activos de lo esperado para nuestra colonia. Esto se puede observar comparando con la **figura 39E** del experimento de terapia génica con timulina y también con lo reportado anteriormente por nuestro grupo (Zappa Villar et al., 2020). Este aumento anormal de actividad también los vimos reflejado en el tiempo de *rearing* (media \pm SEM: $89,37 \pm 7,997$), en el cual la comparación con otros grupos de ratas controles de la misma edad mostró un significativo aumento del tiempo de este comportamiento ($p < 0,0001$; media \pm SEM de colonias previas: $32,12 \pm 3,64$). En cuanto a los parámetros de ansiedad, en el *grooming* no observamos diferencias significativas entre los grupos (**Fig. 44C**) (ANOVA de un factor; $F_{(3,25)} = 0,9405$, $p = 0,4359$), similar a lo mostrado en la terapia con timulina, y referido al tiempo en el área central, aunque no se encontraron diferencias significativas (**Fig. 44D**) (ANOVA de un factor; $F_{(3,25)} = 1,209$, $p = 0,3270$), las ratas control a pesar de caminar mucho por la caja, entraron menos de lo esperado al área central (media \pm SEM: $1,78 \pm 1,25$), en comparación con datos previos de nuestra colonia (media \pm SEM: $15,75 \pm 4,92$). Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que los animales de nuestro experimento se encontraron hiperactivos y más ansiosos de lo normal.

5.6.2 Memoria de reconocimiento y espacial

Al evaluar la memoria de reconocimiento mediante el test RO, encontramos resultados contrarios a los esperados en la evaluación a corto plazo (RO2). En primer lugar, cuando las ratas fueron expuestas a los dos objetos idénticos durante el RO1, a través del I.D. no se detectó preferencia por ninguno de ellos (datos no mostrados). Luego de 90 min (RO2), los animales del grupo control no se comportaron de la manera esperada, si bien exploraron más el objeto nuevo (62% más), el I.D. no resultó significativamente

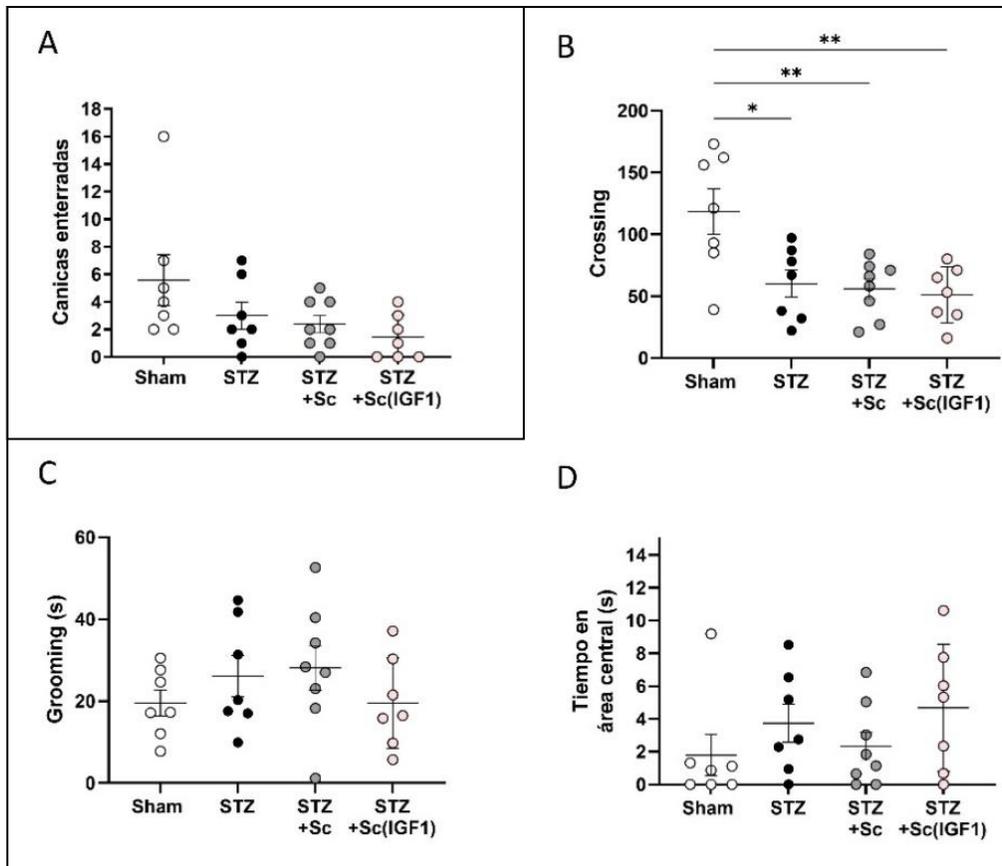


Figura 44: **Enterramiento y comportamiento ansioso alterado en el grupo Sham.** El grupo Sham tuvo un pobre enterramiento de canicas, no difiriendo del grupo STZ como es esperable (A). Comportamiento exploratorio afectado por la STZ (B). Falta de diferencias significativas esperables entre los grupos Sham y STZ en comportamientos que reflejan ansiedad: grooming (C) y tiempo en el área central de la caja (D). Los datos se analizaron mediante ANOVA de un factor y se representaron como media \pm SEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

diferente de 0 ($p = 0,0826$), y al contrario, el grupo STZ mostró un mayor I.D. (Fig. 45A). El grupo STZ+Sc mostró su memoria deteriorada, mientras que el grupo STZ+Sc(IGF1) mostró preferencia por el objeto nuevo (RO2, t-test para una media: Sham: $p = 0,0826$; STZ: $p = 0,0160$; STZ+Sc: $p = 0,9087$; STZ+Sc(IGF1): $p = 0,0405$); consecuentemente, resulta difícil interpretar los resultados obtenidos para los grupos tratados con Sc de células *naïve* (sin transducir) o sobreexpresando IGF1, debido a las anomalías que presentaron los grupos Sham y STZ. Por otro lado, en lo que refiere a la memoria de reconocimiento de largo plazo (RO3), en este caso los animales Sham mostraron un I.D. esperado (mayor a 0), mientras que la STZ afectó a la memoria y no hubo un efecto de ambas terapias en este tipo de memoria (Fig. 45B) (RO3, t-test para una media: Sham: $p = 0,0197$; STZ: $p = 0,3853$; STZ+Sc: $p = 0,2303$; STZ+Sc(IGF1): $p = 0,8958$).

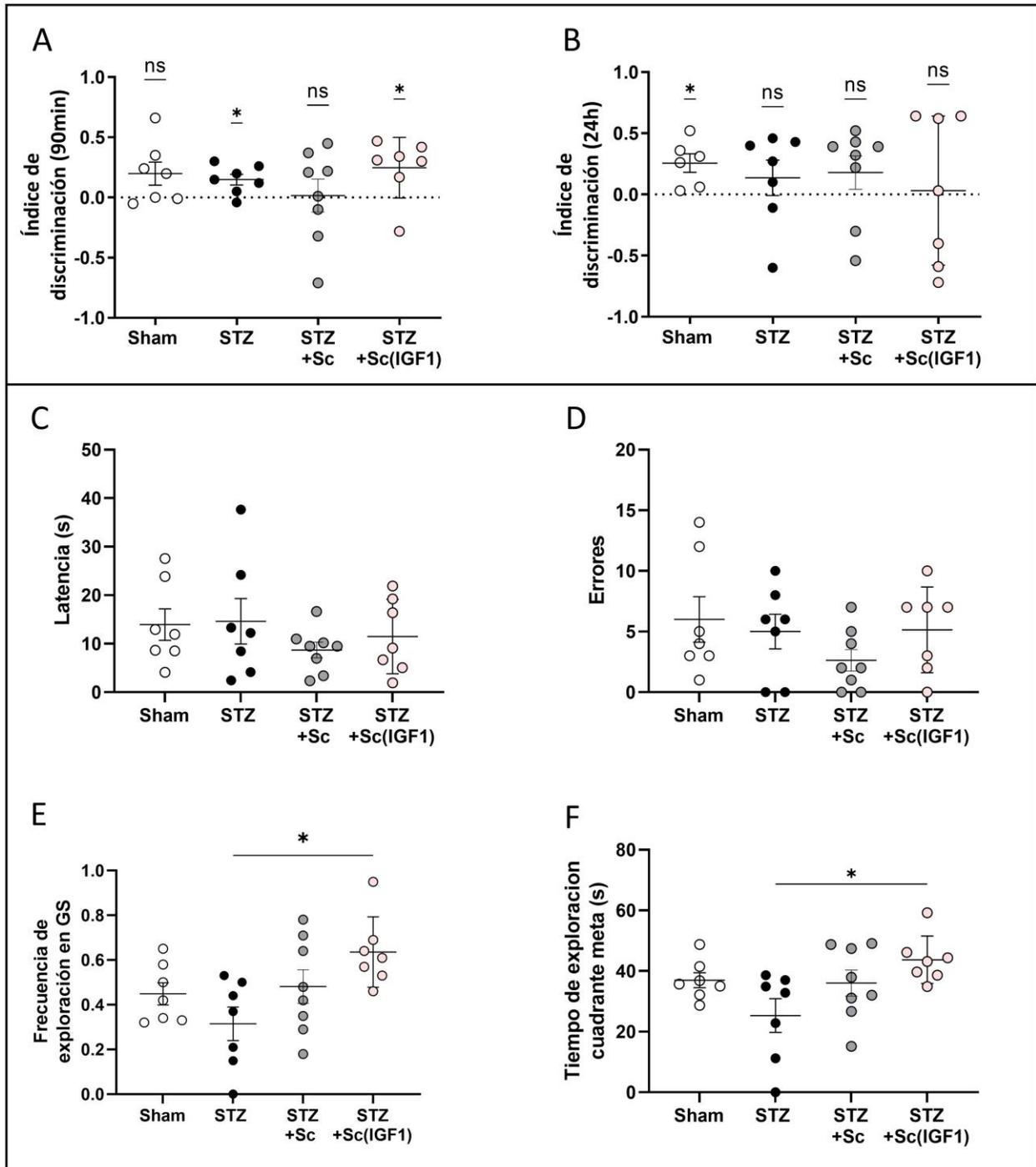


Figura 45: Memoria de reconocimiento del grupo Sham afectada y falta de efecto de la inyección de STZ-icv. El grupo Sham mostró su memoria de reconocimiento de corto plazo afectada, lo contrario para el grupo STZ (A). Resultados esperables en la memoria de reconocimiento a largo plazo (B). Falta de diferencias significativas esperables entre los grupos Sham y STZ en las variables utilizadas para estudiar memoria espacial (C-F). Los datos se analizaron mediante ANOVA de un factor y se representaron como media \pm SEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

En cuanto a la memoria espacial, evaluamos en el PT del LB la latencia, los errores cometidos, la frecuencia de exploración del GS (agujeros -1, 0 y 1) y el tiempo de permanencia en el cuadrante meta de la plataforma. En los cuatro casos, el grupo Sham se comportó de forma esperada, sin embargo, la inyección de STZ no alteró la memoria espacial de los animales. Esto puede observarse en la latencia (**Fig. 45C**) (ANOVA de un factor; $F_{(3,25)}=0,7321$, $p=0,5426$), y el número de errores (**Fig. 45D**) (ANOVA de un factor; $F_{(3,25)}=1,136$, $p=0,3536$), en los que el grupo STZ no tuvo el aumento esperado con respecto al control. Aunque para el grupo STZ se observa una tendencia de disminución de las exploraciones en el GS (**Fig. 45E**) (ANOVA de un factor; $F_{(3,25)}=3,795$, $p=0,0227$) y en el cuadrante meta (**Fig. 45F**) (ANOVA de un factor; $F_{(3,25)}=3,424$, $p=0,0325$), estos parámetros tampoco fueron significativamente distintos a los del grupo Sham. Curiosamente, la administración de Sc(IGF1) generó un aumento de las exploraciones en los alrededores del agujero meta, el cual no fue observado por la administración de Sc *naïve* (**Fig. 45E, F**).

Concluimos que factores no identificados (ambientales o asociados al protocolo) pueden haber afectado el comportamiento de los animales Sham, y, a su vez que la STZ no produjo el efecto esperado en el comportamiento de los animales.

5.6.3 Comportamiento símil depresión

En el NF, el grupo STZ mostró una reducción significativa en la conducta activa comparado con el grupo control, mientras que esta alteración se revirtió en el grupo STZ+Sc(IGF1), y parcialmente en el grupo STZ+Sc (**Fig 46A**) (ANOVA de un factor; $F_{(3,25)}=3,537$, $p=0,0291$). Sin embargo, al evaluar el tiempo de inmovilidad en el tanque de agua, el grupo STZ no mostró un incremento de este comportamiento como es lo esperado (**Fig. 46B**) (ANOVA de un factor; $F_{(3,25)}=1,032$, $p=0,3953$). La comparación entre el tiempo de flote de los animales Sham de este experimento y los del experimento de terapia con timulina, no mostró cambios en este parámetro ($p>0,05$ datos no mostrados); por lo tanto, en este caso los animales Sham no poseían alterado dicho comportamiento. El aumento de conducta activa en los animales tratados con el Sc enriquecido con IGF1 sugiere un potencial efecto benéfico de esta terapia.

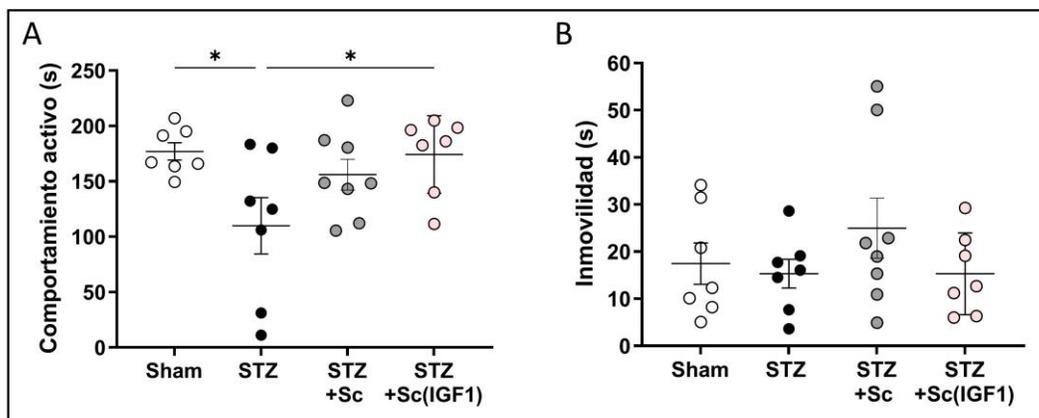


Figura 46: Comportamiento símil depresión parcialmente incrementado por STZ-icv. La STZ provocó una disminución en la conducta activa que refleja motivación de escape del tanque, lo cual fue revertido por la terapia con Sc enriquecido en IGF1 (A). No se observaron diferencias significativas en el tiempo de inmovilidad (B). Los datos se analizaron mediante ANOVA de un factor y se representaron como media \pm SEM. * $p<0,05$.

5.7 Discusión del experimento de terapia con secretoma de células madre mesenquimales

Este experimento estuvo diseñado para probar el potencial terapéutico combinado entre el Sc de MSC y el IGF1. El experimento fue impulsado por nuestros resultados previos de terapia génica con IGF1 mostrados en este capítulo, y resultados previamente publicados de terapia celular con MSC de cordón umbilical humano en el modelo de STZ-icv. En dicho trabajo mostramos que las MSC inyectadas de forma iv, fueron eficientes en revertir de forma total o parcial el deterioro conductual (específicamente ansiedad, exploración, comportamiento típico de especie y memoria espacial), y la neurodegeneración (volumen del SR y neuronas maduras de CA1), causados por STZ-icv en ratas, a los 3 meses post lesión (Zappa Villar et al., 2020). Para combinar ambas estrategias, generamos MSC de cordón umbilical humano *naïve* y que sobreexpresaran IGF1, y recolectamos su Sc. La elección de trabajar con el Sc de MSC se basó en las ventajas que tiene con respecto a trabajar con células, las cuales consisten en su fácil administración en animales, la reducción del riesgo de rechazo, la reducción de formación de tejido ectópico o trombosis, y por supuesto, su rica composición en moléculas con un amplio espectro de acción biológica, como citoquinas, factores de crecimiento, micro RNAs, lípidos, vesículas extracelulares, etc (Eleuteri & Fierabracci, 2019). Adicionalmente, el interés de trabajar con Sc celular proviene de la búsqueda de una estrategia no basada en inyecciones, de manera que sea menos invasiva para el animal. Las ratas fueron tratadas con Sc de MSC *naïve* y de MSC que sobreexpresaran IGF1, para poder discriminar entre efectos causados únicamente por el Sc o por su combinación con IGF1.

Al evaluar los resultados de comportamiento, encontramos que tanto las ratas control como las tratadas con STZ, no se comportaron de la manera esperada en la mayoría de las pruebas. Brevemente, en cuanto a los animales control, encontramos el comportamiento típico de especie afectado, debido a que el enterramiento de canicas fue bajo, similar al de los grupos tratados con STZ. El enterramiento de canicas es un comportamiento robusto y natural de las ratas (de Brouwer et al., 2019), y se ha sugerido que puede ser tomado como un equivalente a actividades diarias en humanos, que probablemente sean el resultado de la integración de la actividad de diversas áreas cerebrales. Durante el test de CA, las ratas control se mostraron activas en los bordes de la caja aunque ingresando muy poco al área central, lo cual puede ser un signo de aumento de ansiedad. Por otro lado, el grupo Sham tuvo afectada la memoria de reconocimiento de corto plazo, mientras que en el resto de las evaluaciones (reconocimiento a largo plazo y memoria espacial), estos animales se comportaron de manera normal. Tampoco se evidenciaron alteraciones en el comportamiento similar depresión.

Por otro lado, los animales STZ, al contrario de los controles, se comportaron de forma esperada en el test de MB, mostrando un enterramiento casi nulo de canicas, y en el CA no hubo mayores diferencias con respecto al grupo Sham, salvo una disminución en la exploración, que si bien fue documentada por nuestro grupo previamente (Zappa Villar et al., 2020), en este caso la diferencia podría estar debida al comportamiento exacerbado del control. Resulta llamativo que el grupo STZ mostrara preferencia por el objeto nuevo durante el RO2, lo que indica que estos animales no tuvieron afectada la memoria de reconocimiento a corto plazo como se esperaría, aunque si la de largo plazo. Los animales STZ tampoco se diferenciaron significativamente del grupo Sham en el LB, y por otra parte, tuvieron un comportamiento similar depresivo parcialmente aumentado, dado por una disminución de la conducta activa pero no en un incremento del tiempo de flotación. Finalmente, las únicas diferencias de los grupos tratados con Sc se

observaron en el grupo Sc+IGF1 en la memoria espacial y el comportamiento símil depresión, mostrando una mejora de estos parámetros. A pesar de las anomalías encontradas, los resultados del grupo Sc+IGF1 sugieren un potencial efecto benéfico de la terapia combinada.

Es posible que los efectos observados en el grupo de Sc+IGF1 se deban a un acceso al cerebro del IGF1 y de las moléculas que componen el Sc completo de la MSC de cordón umbilical humano, ya que la región olfativa de las fosas nasales proporciona vías extracelulares e intracelulares al SNC, que evitan la BHE (Illum, 2000), de ahí el interés por las terapias administradas de forma intranasal. Dependiendo de la expresión de receptores en el epitelio olfatorio y de la naturaleza de la molécula, estas pueden llegar al cerebro en minutos ya sea por migración por hendiduras intercelulares abiertas del epitelio olfativo hasta los bulbos olfatorios, como se ha demostrado en roedores y primates (Balin et al., 1986); o si son endocitadas, por un transporte axoplásmico anterógrado en las neuronas sensoriales olfativas, (Broadwell & Balin, 1985) luego de 6 horas de su administración. Por otro lado, también se describió la vía de entrada a través del nervio trigeminal, sugerida como una vía adicional para la entrada de IGF1 administrado intranasal (Thorne et al., 2004). En dicho trabajo se demostró que el IGF1 marcado radioactivamente puede llegar al cerebro en ratas SD tras solo 30 minutos luego de su administración. La intensidad de la señal fue máxima en porciones del bulbo olfatorio, el nervio trigémino y la corteza cerebral, regiones a partir de las cuales se observó un gradiente decreciente con la distancia desde los conductos nasales. Además, estos autores demostraron que el IGF1 conservó su actividad ya que se observó un aumento de la fosforilación de residuos tirosina, en concordancia con el tipo de receptor que este péptido puede activar (Thorne et al., 2004). Por otro lado, recientemente un grupo mostró que en ratas acostumbradas a tomar etanol y autoadministrarse nicotina, la instilación de Sc de MSC derivadas de tejido adiposo, inhibió notablemente la ingesta crónica de estas sustancias, y disminuyó tanto el aumento del estrés oxidativo como la reactividad de los astrocitos y la microglía en el hipocampo (Quintanilla et al., 2019).

Debido al comportamiento ansioso aumentado en los controles y la falta de deterioro en la memoria de los animales con STZ, se tomó la decisión de no procesar los cerebros. Hipotetizamos que diversos factores pueden haber influenciado en el comportamiento de las ratas, como se detalla a continuación.

Por un lado, es necesario considerar que existen numerosos factores que pueden influenciar las medidas conductuales, ya que sutiles diferencias de procedimiento o en el medio ambiente, pueden alterar los resultados. Por ejemplo, además de los factores más conocidos que pueden influir los resultados de test comportamentales como el ruido, la luz, los olores fuertes (Saré et al., 2021), existen otros un poco más sutiles como la humedad del ambiente de testeo (Chesler et al., 2002), la profundidad y/o tipo de cama (Hauzenberger et al., 2006; Tanaka et al., 2014), y el sexo del experimentador (Georgiou et al., 2022; Sorge et al., 2014). En 2020, el confinamiento por aumento de casos positivos de SARS-CoV-2, se produjo en simultáneo al momento en que las ratas de experimentación contaban con los 3 meses de edad necesarios para inyectar la STZ-icv. Por lo tanto, factores relacionados a la pandemia de SARS-CoV-2, podrían haber influenciado la conducta de las ratas, ya que el periodo post STZ que incluye la manipulación de los animales para realizar los test de comportamiento, se vio caracterizado por circunstancias especiales. Por ejemplo, la implementación de medidas de seguridad estrictas podría haber introducido estrés adicional en las ratas de laboratorio. Esto es porque el uso de equipos de protección personal como gafas y máscaras especiales, el distanciamiento social y las medidas fuertes de desinfección podrían haber afectado el ambiente de las ratas de laboratorio y potencialmente influir en su comportamiento durante los experimentos. Se ha demostrado que los roedores son sensibles a los estados emocionales, y muestran

un fuerte contagio emocional de la angustia, mostrando signos de miedo y sensibilidad al dolor alterada cuando presencian el miedo o el dolor de otros roedores, y esto se basa en estructuras neuronales homólogas a las que se activan cuando los humanos sienten empatía (Keysers et al., 2022).

En segundo lugar, es necesario considerar problemas en la preparación de STZ, o el uso de un lote de droga fallado. La STZ en solución se vuelve un compuesto químicamente muy inestable, por lo tanto es importante que las soluciones a inyectar sean preparadas el día de la cirugía estereotáxica. Pequeñas variaciones en el pH o la composición del vehículo podrían haber causado una falla en la generación del modelo. En resumen, la inyección de STZ resulta un paso crítico que está sujeto a procedimientos experimentales susceptibles a error y variabilidad, como la preparación de la droga y la inyección estereotáxica, lo que constituye una desventaja con respecto a los otros modelos de EA no farmacológicos. Por lo tanto, resulta fundamental la realización de baterías de pruebas conductuales y el conocimiento del comportamiento esperado de los animales para detectar posibles fallas.

Por último, consideramos que el protocolo utilizado para instilar el Sc de forma intranasal puede haber influido en el comportamiento de nuestros animales. El isoflurano es el anestésico volátil más ampliamente utilizado en experimentación preclínica con roedores (Richardson & Flecknell, 2005), aunque algunos trabajos muestran que, dependiendo del modelo y la condición patológica del cerebro, los anestésicos volátiles, incluidos el isoflurano, pueden tener efectos neuroprotectores o neurotóxicos. Por ejemplo, en modelos de lesiones hipóxicas, en donde se provoca la activación de una respuesta inflamatoria local, el tratamiento con isoflurano redujo el volumen del infarto a corto plazo, así como atrofia cerebral y déficits neuroconductuales a largo plazo, efectos que podrían estar mediados por activación de la vía de PI3K (Zhou et al., 2010). En experimentos *in vitro* con células microgliales BV2 tratadas con LPS, se mostró que el tratamiento con isoflurano o propofol disminuía la expresión de IL-1 β pero no de TNF α ni IL-6 (Tanaka et al., 2013). Por otro lado, en cultivo primario de astrocitos corticales, el isoflurano produjo un aumento de la expresión de la enzima iNOS, junto con una sobreproducción de óxido nítrico, IL6 y MCP-1 (C. Zhang et al., 2021). En dos modelos distintos de EA, se observó que una exposición de isoflurano durante 10 horas en 5 días redujo las placas amiloides en el hipocampo y mejoró la memoria espacial de ratones transgénicos (APP^{swe},PSEN1^{dE9})85Dbo/J (D. Su et al., 2012), mientras que una exposición más corta de isoflurano no alteró el comportamiento, la amiloidopatía, la inflamación ni la apoptosis en ratones transgénicos Tg2576 (Borgstedt et al., 2022). En resumen, las diferencias en los modelos, edad de los animales, concentración de isoflurano y tiempo de exposición hacen difícil la comparación de estos resultados, pero indican que el isoflurano podría haber influenciado el comportamiento de nuestros animales, tanto controles como tratadas con STZ.

En conclusión, alguno, o varios, de los factores mencionados anteriormente puede haber alterado de forma no esperada el cerebro y el comportamiento de los animales, ya que este último es un reflejo de los cambios a nivel molecular, bioquímico y celular, que ocurren en el SNC.

5.8 Conclusión

Nuestro estudio proporciona pruebas sólidas del efecto beneficioso del IGF1 para restaurar la función cognitiva en el modelo de EAe de corto plazo, generado por inyección de STZ-icv. Resulta valioso advertir que proporcionando al SNC de factores adecuados para promover su regeneración, el comportamiento

alterado en los animales puede ser mejorado o revertido. Mecánicamente, proponemos que la señalización de IGF1 amortigua la relación pTau/Tau, estimula la expresión de las proteínas sinápticas del hipocampo y la neurogénesis, y convierte las células microgliales en un fenotipo antiinflamatorio reactivo. El potente efecto del IGF1 en el comportamiento de los animales se ha visto reflejado en nuestros resultados de memoria espacial y comportamiento similar depresivo, luego de la instilación con Sc de MSC enriquecido en IGF1.

Por otro lado, demostramos por primera vez que la timulina tiene un potencial benéfico inmunomodulatorio sobre la microglía y los astrocitos en un modelo de enfermedad neurodegenerativa, ya que al promover cambios en la reactividad glial, restauró la memoria de reconocimiento y tuvo efectos en la ansiedad, la exploración y el comportamiento similar depresión.

6 Capítulo VI: Estudio del efecto de la STZ-icv en ratas hembra y comparación con el modelo de enfermedad de Alzheimer esporádica en ratas macho

6.1 Objetivos

- Evaluar si la administración de STZ a corto plazo genera un modelo de EAe en ratas hembra. Adicionalmente, estudiar si la depleción de hormonas ováricas mediante ovariectomía incrementa la vulnerabilidad de las ratas a la STZ. Analizar: comportamiento, expresión de proteínas marcadoras de EA, microglía reactiva, neuronas inmaduras y morfometría, en el hipocampo.
- Comparar el efecto de la STZ-icv entre ratas macho y hembra, con y sin ovarios, en el comportamiento, la reactividad astrocítica, las sinapsis y las neuronas inmaduras en el hipocampo.

6.2 Resultados de inyección de STZ-icv en ratas hembra con ovarios y ovariectomizadas

6.2.1 Variación del peso corporal después de la ovariectomía y de la inyección de STZ

Los cambios en el peso corporal se evaluaron en todos los animales a intervalos regulares. La **figura 47A** muestra la progresión del peso corporal a lo largo de los días y el recuadro (**Fig. 47B**) la ganancia del peso entre los DE 0 y +8. Las ratas inyectadas con STZ evidenciaron una pérdida significativa de peso ocho días después de la inyección (**Fig. 47B**) (ANOVA de dos factores; factor OVX: $F_{(1, 28)} = 0,005436$, $p = 0,9418$; factor STZ: $F_{(1, 28)} = 97,97$, $p < 0,0001$; interacción: $F_{(1, 28)} = 14,84$, $p = 0,0006$), como se describió previamente en ratas macho. A partir de ese momento, las ratas STZ iniciaron una recuperación progresiva del peso corporal. Desde el DE +8 hasta el final del experimento, la media de peso del grupo OVX+LCRa fue la más alta entre los grupos, y fue significativamente más alta que las medias de los grupos OVX+STZ y Sham+LCRa en puntos de tiempo específicos (ED+8, ED+23, ED+30), dependiendo del grupo (**Fig. 47A**) (ANOVA de tres factores; factor OVX: $F_{(1, 28)} = 17,47$, $p = 0,0003$; factor STZ: $F_{(1, 28)} = 6,735$, $p = 0,0149$; factor tiempo: $F_{(2, 281, 63, 86)} = 117,5$, $p < 0,0001$, interacción: $F_{(7, 196)} = 8,303$, $p < 0,0001$). En conclusión, la OVX aumentó el peso corporal mientras que la administración de STZ produjo una disminución del mismo hasta 8 días post inyección.

6.2.2 La STZ-icv afecta el enterramiento y el comportamiento exploratorio dependiendo del estatus ovárico

En el test de MB (**Fig. 49A**), la STZ no tuvo efecto en ratas con ovarios en comparación con el grupo control. Sin embargo, en ratas OVX, la STZ disminuyó significativamente la cantidad de canicas enterradas en comparación con el grupo control OVX (**Fig. 49B**) (ANOVA de dos factores de datos transformados logarítmicamente, factor OVX: $F_{(1, 28)} = 0,0865$, $p = 0,7708$; factor STZ: $F_{(1, 28)} = 10,96$, $p = 0,0026$; interacción $F_{(1, 28)} = 3,596$, $p = 0,0683$).

Por otro lado, en el test de CA, la ovariectomía *per se* no modificó ninguno de los parámetros de exploración y ansiedad evaluados. El tratamiento con STZ en ratas con ovarios disminuyó el comportamiento exploratorio, evidenciado por una reducción significativa en el número de *crossing* (**Fig.**

49C) y el tiempo de *rearing* (**Fig. 49D**), en comparación con el grupo Sham+LCRa (ANOVA de dos factores; Crossing: factor OVX: $F_{(1, 28)} = 0,6486$, $p = 0,4274$; factor STZ: $F_{(1, 28)} = 10,69$, $p = 0,0029$; interacción $F_{(1, 28)} = 2,065$, $p = 0,1618$; Rearing: factor OVX: $F_{(1, 28)} = 2,788e^{-005}$, $p = 0,9958$; factor STZ: $F_{(1, 28)} = 8,377$, $p = 0,0073$; interacción $F_{(1, 28)} = 1,117$, $p = 0,2996$).

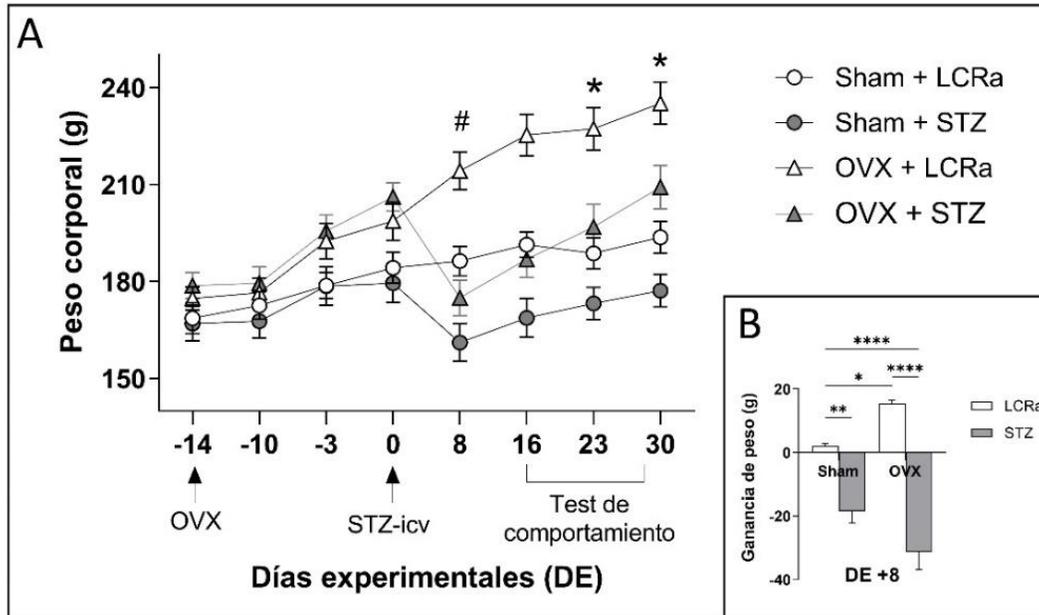


Figura 47: Cambios en el peso corporal post STZ y ovariectomía. El peso corporal de todas las ratas se registró a lo largo del experimento (A). En el DE +8, las ratas inyectadas con STZ presentaron una ganancia de peso negativa, lo contrario para las ratas control ovariectomizadas, que tuvieron un aumento de peso mayor que las ratas control con ovarios (B). Luego del DE +8, los grupos con STZ comenzaron a recuperar su peso corporal. Los datos se analizaron mediante ANOVA de tres factores con medidas repetidas (A) o ANOVA de dos factores (B) y se expresaron como media \pm SEM. Los asteriscos marcan diferencias entre OVX+LCRa y Sham+LCRa. El símbolo numeral marca diferencia entre OVX+LCRa y OVX+STZ. * $p < 0,05$, # $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$.

En el tiempo de inmovilidad del CA observamos tendencias a aumentar en los animales tratados con STZ, aunque no hubo diferencias significativas entre los grupos (**Fig. 49E**). Sin embargo, debido a una interacción de factores no significativa, se observaron los efectos principales, mostrando un efecto significativo de la inyección de STZ en aumentar el tiempo inmóvil en ratas (ANOVA de dos factores de datos transformados logarítmicamente; factor OVX: $F_{(1, 28)} = 0,1370$, $p = 0,7141$; factor STZ: $F_{(1, 28)} = 9,517$, $p = 0,0045$; interacción $F_{(1, 28)} = 0,4101$, $p = 0,5271$). En cuanto al acicalamiento (*grooming*), el cual es considerado una conducta de ansiedad si se realiza excesivamente, no hubo diferencias significativas entre los cuatro grupos experimentales (**Fig. 49F**) (ANOVA de dos factores de datos transformados logarítmicamente; factor OVX: $F_{(1, 28)} = 0,7519$, $p = 0,3932$; factor STZ: $F_{(1, 28)} = 1,767$, $p = 0,1945$; interacción $F_{(1, 28)} = 1,745$, $p = 0,1972$).

Por lo tanto, nuestros resultados muestran que, dependiendo del tipo de comportamiento evaluado, la combinación de ovariectomía y STZ puede alterar o no la conducta de las ratas

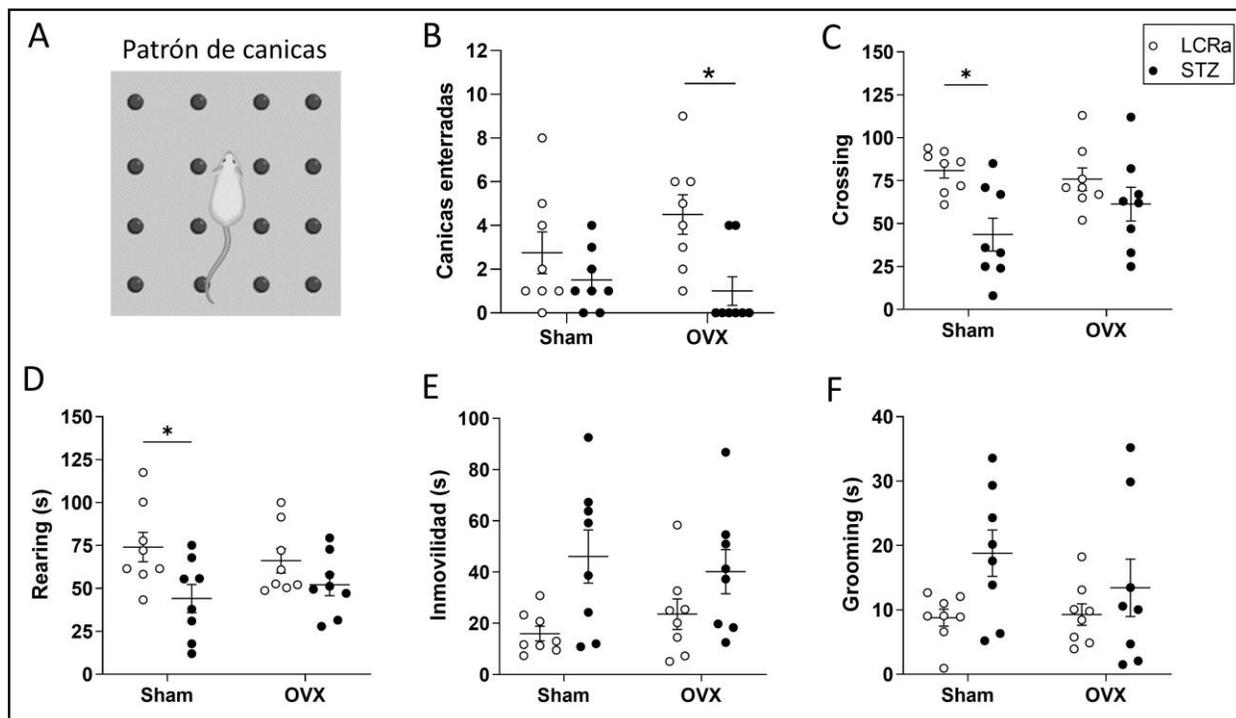


Figura 49: *Enterramiento y comportamiento exploratorio afectado por la STZ-icv dependiendo el estado ovárico de las hembras.* En el MB (esquema de patrón de canicas [A]), la STZ causó una disminución del enterramiento de canicas al ser inyectada en ratas sin ovarios (B). El comportamiento exploratorio en el CA se vio afectado por la STZ en ratas con ovarios, con una disminución en el *crossing* (C) y en el *rearing* (D). La STZ no afectó significativamente la ansiedad medida por el tiempo de inmovilidad (E) y de *grooming* (F), aunque se observó cierta tendencia a aumentar dichos comportamientos. Los datos se analizaron mediante ANOVA de dos factores y se representaron como media \pm SEM. * $p < 0,05$

6.2.3 Memoria de reconocimiento afectada por la STZ y la ovariectomía

La memoria de reconocimiento se evaluó a corto (90 min) y largo plazo (24 h). Cuando las ratas fueron expuestas a los dos objetos idénticos durante el RO1, no se detectó preferencia por ninguno de ellos (para cada grupo, el I.D. no fue significativamente diferente de 0, $p > 0,05$).

A corto plazo, ambos grupos control (Sham+LCRa y OVX+LCRa) presentaron un I.D. significativamente superior a 0 como resultado de la preferencia por el ON, lo que indica que la memoria de reconocimiento no se vio afectada por el procedimiento de inyección icv o la ovariectomía (Fig. 50A) (t-test de una muestra; Sham+LCRa: $p = 0,0054$; OVX+aCSF: $p = 0,0167$). Por el contrario, las ratas inyectadas con STZ (con y sin ovarios) tuvieron un I.D. que no fue diferente a 0, lo que se interpreta como un deterioro en la memoria de reconocimiento (Fig. 50A) (t-test de una muestra; Sham+STZ: $p = 0,2591$; OVX+STZ: $p = 0,5566$). Por otro lado, cuando se evaluó la memoria de reconocimiento después de 24 h, observamos que tanto la STZ-icv como la ovariectomía afectaron la memoria de los animales (Fig. 50B) (t-test de una muestra; Sham+LCRa: $p = 0,0297$; Sham+STZ: $p = 0,3635$; OVX+LCRa: $p = 0,0642$; OVX+STZ: $p = 0,1696$). Por lo tanto, la STZ-icv afectó la memoria de reconocimiento tanto a corto como a largo plazo, independientemente del estado ovárico de los animales; por otro lado, la depleción de hormonas ováricas afectó la memoria de reconocimiento únicamente a largo plazo.

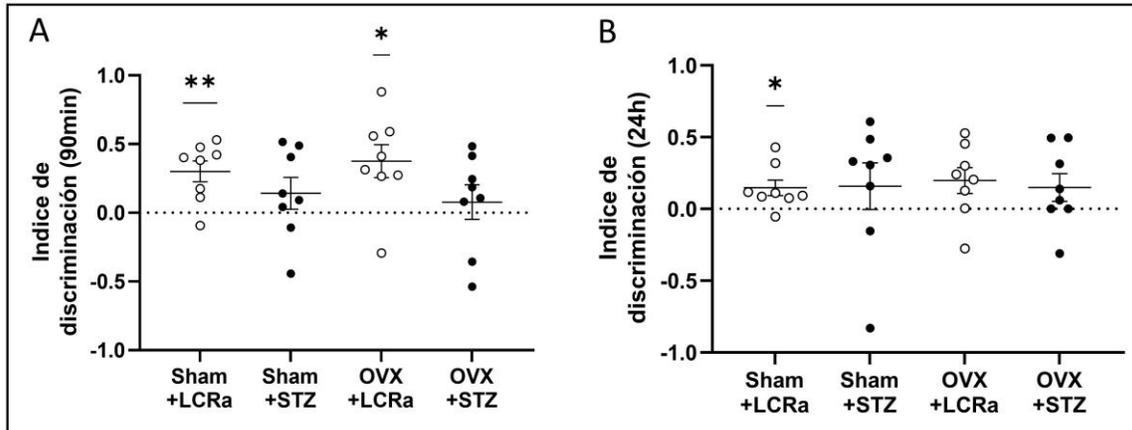


Figura 50: **Deterioro de la memoria de reconocimiento por la STZ-icv y la ovariectomía.** Noventa minutos luego de la fase de entrenamiento (RO1), las ratas inyectadas con STZ no mostraron preferencia por el objeto nuevo, lo cual indica memoria afectada (A). Al repetir el test 24 h después del RO1, tanto la STZ como la ovariectomía afectaron este tipo de memoria (B). Las comparaciones se hicieron contrastando el índice de discriminación con el nivel de azar 0 (t-test de una muestra). Todos los datos se representaron como media \pm SEM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

6.2.4 Memoria espacial en ratas hembra tras la inyección de STZ-icv

En el LB no se encontraron diferencias significativas entre los grupos en la latencia (Fig. 51A) ni en los errores durante el PT (Fig. 51B), aunque se observó una tendencia general de aumento en estos parámetros en los grupos tratados con STZ. En el número total de exploraciones tampoco se encontraron diferencias entre los grupos, aunque debido a que la interacción entre los factores no fue significativa, se realizó una evaluación de los efectos principales, mostrando que la STZ tuvo un impacto en el comportamiento exploratorio, provocando una reducción de este parámetro (Fig. 51C) (ANOVA de dos factores, factor OVX: $F_{(1, 28)} = 0,02253$, $p = 0,8818$; factor STZ: $F_{(1, 28)} = 5,768$, $p = 0,0232$; Interacción: $F_{(1, 28)} = 1,104$, $p = 0,3024$).

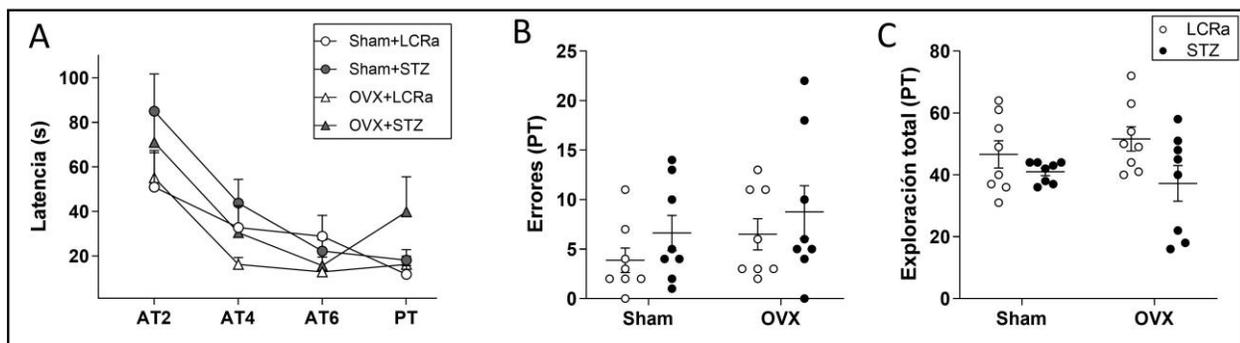


Figura 51: **Memoria espacial en ratas hembra inyectadas con STZ-icv.** Memoria espacial evaluada mediante el LB. El test post hoc no mostró diferencias entre los grupos en la latencia a encontrar el agujero meta en los AT2, 4, 6 y PT (A). No se observaron diferencias entre los grupos en el número de errores cometidos (B), ni en la exploración total durante en el PT (C). Los datos se analizaron mediante ANOVA de dos factores (B y C), y con medidas repetidas (A). Los datos se representaron como media \pm SEM.

6.2.5 La STZ-icv y la ovariectomía aumentaron el comportamiento similar depresión

En el test de NF, observamos que en comparación con el grupo Sham+LCRa, tanto la STZ como la OVX generaron una disminución en el comportamiento activo de las ratas para escapar del tanque de agua, la cual fue más pronunciada en el grupo con la combinación de ambas intervenciones (**Fig. 52A**) (ANOVA de dos factores; factor OVX: $F_{(1, 28)} = 18,56$, $p = 0,0002$; factor STZ: $F_{(1, 28)} = 13,55$, $p = 0,0010$; interacción: $F_{(1, 28)} = 1,040$, $p = 0,3166$). Con respecto a la inmovilidad o flotación, las ratas OVX mostraron un aumento en este comportamiento pasivo en comparación con las ratas Sham con ovarios (**Fig. 52B**) (ANOVA de dos factores; factor OVX: $F_{(1, 28)} = 5,894$, $p = 0,0219$; factor STZ: $F_{(1, 28)} = 1,731e^{-5}$, $p = 0,9967$; interacción: $F_{(1, 28)} = 7,517$, $p = 0,0105$). Por lo tanto, tanto la STZ como la ovariectomía afectan a la motivación de escape de las ratas, lo que es interpretado como un aumento en el comportamiento similar depresivo.

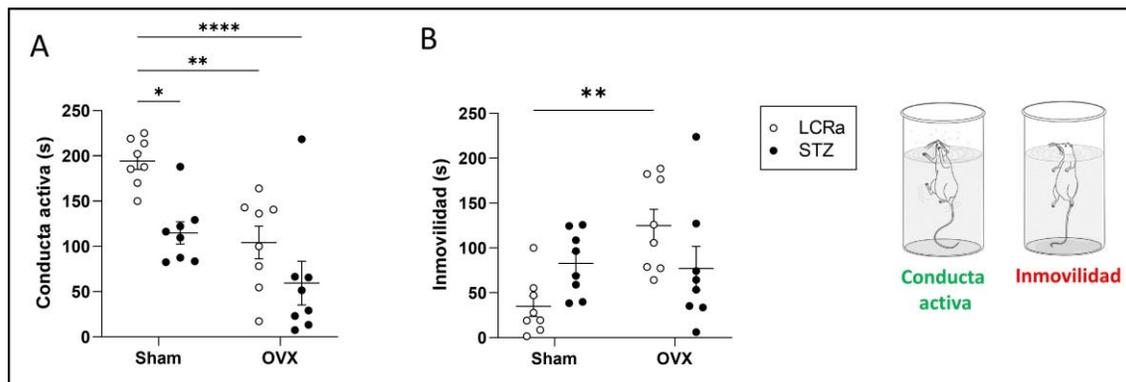


Figura 52: Aumento del comportamiento similar depresión por STZ-icv y ovariectomía. Una disminución en la conducta activa (motivación para escapar del tanque) (A) y aumento del tiempo de flotación o inmovilidad (B) reflejan un comportamiento similar depresión, inducido por la STZ-icv y la ovariectomía. Los datos se analizaron mediante ANOVA de dos factores y se representaron como media \pm SEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$.

6.2.6 La STZ-icv no aumentó la expresión de proteínas relevantes para la enfermedad de Alzheimer

Mediante WB, se evaluaron dos fosforilaciones diferentes en la proteína Tau en lisados de hipocampo, específicamente la fosforilación en Thr231 (AT180) y Ser396. No se encontraron diferencias significativas entre los cuatro grupos experimentales para ninguna de ellas (**Fig. 53A, B**) (ANOVA de dos factores; 53A) factor OVX: $F_{(1, 28)} = 0,03143$, $p = 0,8606$; factor STZ: $F_{(1, 28)} = 0,04095$, $p = 0,8411$; interacción: $F_{(1, 28)} = 3,079$, $p = 0,0903$; 53B) factor OVX: $F_{(1, 28)} = 0,9499$, $p = 0,3381$; factor STZ: $F_{(1, 28)} = 1,018$, $p = 0,3216$; interacción: $F_{(1, 28)} = 0,3746$, $p = 0,5455$). Asimismo, el nivel de expresión del péptido βA no se vio afectado por la STZ en los animales con o sin ovarios (**Fig. 53C**) (ANOVA de dos factores, factor OVX: $F_{(1, 28)} = 0,2809$, $p = 0,6003$; factor STZ: $F_{(1, 28)} = 0,3117$, $p = 0,5811$; interacción: $F_{(1, 28)} = 0,002522$, $p = 0,9603$). En conclusión, el diseño experimental utilizado en este trabajo no genera en ratas hembra, el aumento típico de pTau y péptido βA encontrado en machos con STZ-icv, a este mismo plazo de evaluación post inyección.

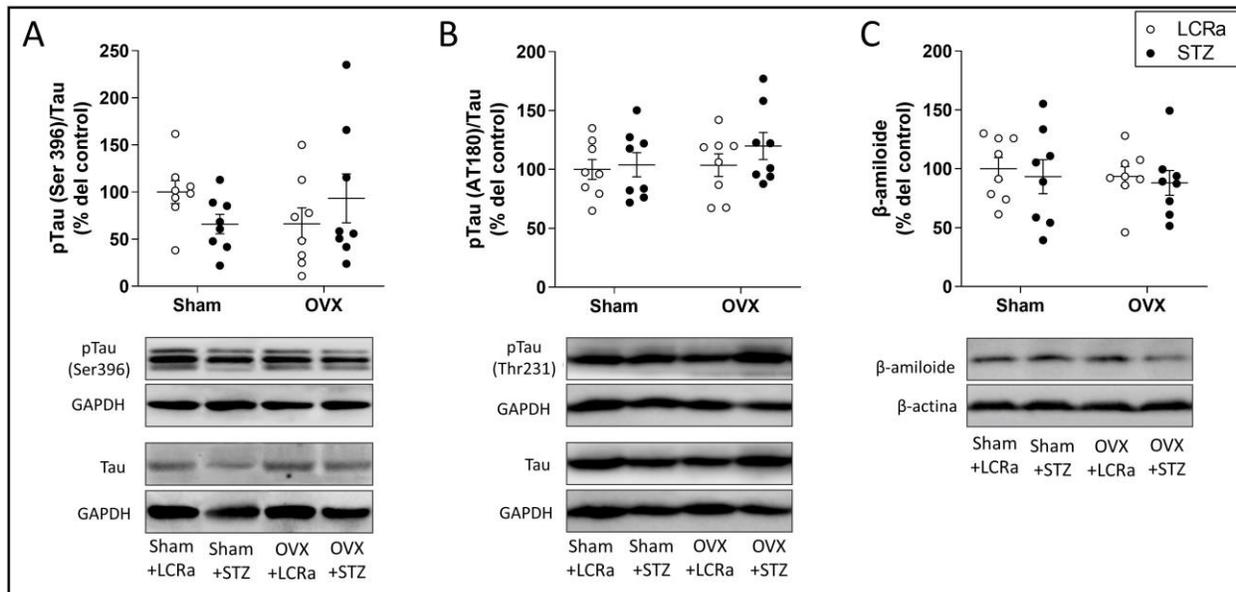


Figura 53: La STZ-icv no aumentó la fosforilación de tau ni la expresión del péptido β A. No se observaron diferencias significativas en la fosforilación de Tau en Ser396 (A) ni en Thr231(AT180) (B), ni tampoco en los niveles del péptido β A (C). Los datos se analizaron mediante ANOVA de dos factores y se representaron como media \pm SEM.

6.2.7 La STZ-icv afecta a las neuronas maduras e inmaduras del giro dentado

El volumen ocupado por las neuronas maduras que forman parte de la capa granular del GD fue cuantificado a partir de una tinción con Nissl (Fig. 54B). La STZ-icv tuvo un impacto negativo sobre las neuronas granulares en el GD, ya que los grupos Sham+STZ y OVX+STZ mostraron una disminución significativa en el volumen de esta capa en comparación con las ratas Sham+LCRa (Fig. 54A) (ANOVA de dos factores; factor OVX: $F_{(1, 28)} = 0,5624$, $p = 0,4596$; factor STZ: $F_{(1, 28)} = 10,28$, $p = 0,0034$; interacción $F_{(1, 28)} = 6,698$, $p = 0,0151$).

En cuanto a las neuronas inmaduras, el número se redujo drásticamente por la inyección de STZ (en ratas con y sin ovarios) y, curiosamente, el grupo OVX+STZ mostró menos neuronas inmaduras que las ratas STZ con ovarios (Fig. 54C) (ANOVA de dos factores; factor OVX: $F_{(1, 28)} = 14,43$, $p = 0,0007$; factor STZ: $F_{(1, 28)} = 64,90$, $p < 0,0001$; interacción: $F_{(1, 28)} = 0,01514$, $p = 0,9029$). En conclusión, las neuronas del GD son altamente vulnerables a la STZ en ratas hembra, y nuestros resultados sugieren una reducción en la neurogénesis hipocampal. Adicionalmente, observamos que las neuronas inmaduras fueron más susceptibles a la inyección de STZ en ratas sin ovarios.

6.2.8 Aumento de reactividad microglial por inyección de STZ-icv y ovariectomía

Las células microgliales se estudiaron a través de IHQ para Iba1 en tres regiones hipocampales distintas: el DH del GD (Fig. 55E, F), el SR de CA3 (Fig. 56A, B) y el SR de CA1 (Fig. 56C, D). La STZ en animales sin ovarios promovió un aumento en el número total de células microgliales en las tres regiones analizadas, un cambio que no fue evidenciado por la inyección de STZ en hembras con ovarios. Sin embargo, al analizar la morfología de las células, ambos grupos tratados con STZ (Sham+STZ y OVX+STZ) presentaron resultados comparables, con un aumento significativo de la reactividad de estas células con respecto a sus controles.

Los resultados estadísticos para el porcentaje de células reactivas son los siguientes, según la región estudiada: ANOVA de dos factores; para el DH: factor OVX: $F_{(1,28)} = 1,994$, $p = 0,1689$; factor STZ: $F_{(1,28)} = 75,20$,

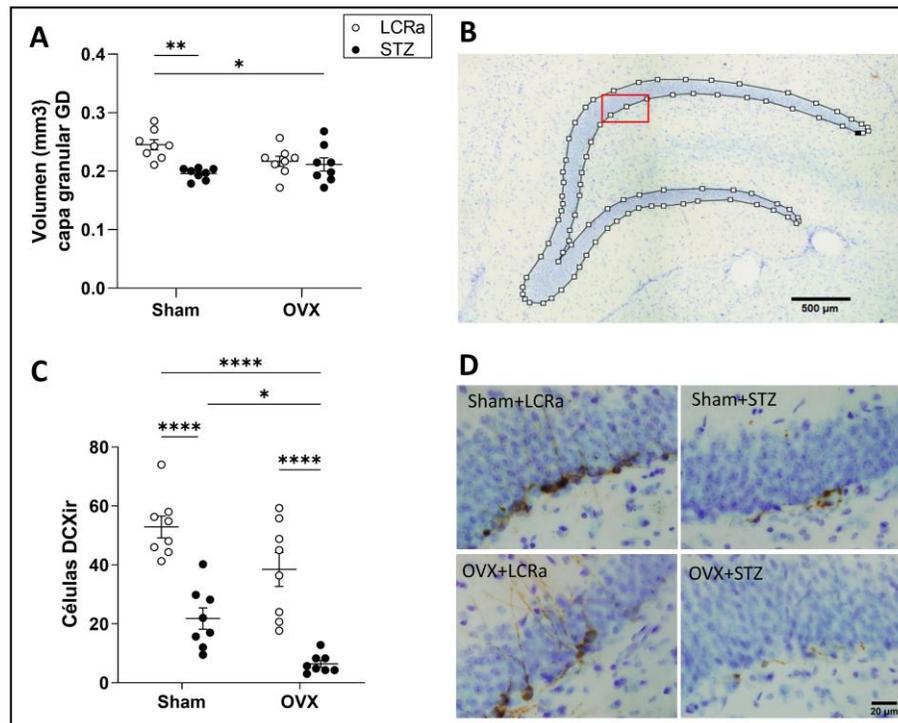


Figura 54: Disminución de neuronas en el GD por STZ-icv en ratas con y sin ovarios. Las neuronas maduras de la capa granular del GD fueron afectadas por la STZ-icv, independientemente del estatus ovárico (A). Mosaico del GD en sección coronal, marcando como ROI la capa granular en toda su longitud, teñida con Nissl; rectángulo rojo marcando SGZ donde se encuentran los progenitores de neuronas que originan células inmaduras DCX-ir; barra de escala: 500 μm (B). Disminución del número de neuronas inmaduras por inyección de STZ y efecto potenciado por combinación de STZ y ovariectomía (C). Secciones coronales del GD, con IHQ para Iba1 y tinción de Nissl, representativas de cada grupo experimental; barra de escala: 20 μm (D). Los datos se analizaron mediante ANOVA de dos factores y se representaron como media \pm SEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$.

$p < 0,0001$; interacción: $F_{(1,28)} = 2,449$, $p = 0,1288$. Para SR CA3: factor OVX: $F_{(1,28)} = 0,001619$, $p = 0,9682$; factor STZ: $F_{(1,28)} = 23,18$, $p < 0,0001$; interacción: $F_{(1,28)} = 0,1205$, $p = 0,7310$. Para SR CA1: factor OVX: $F_{(1,28)} = 0,4809$, $p = 0,4937$; factor STZ: $F_{(1,28)} = 87,91$, $p < 0,0001$; interacción: $F_{(1,28)} = 0,3659$, $p = 0,5501$).

Los resultados estadísticos para el número de células Iba1 totales son los siguientes, según la región estudiada: ANOVA de dos factores; para el DH: factor OVX: $F_{(1,28)} = 0,005110$, $p = 0,9435$; factor STZ: $F_{(1,28)} = 14,02$, $p = 0,0008$; interacción $F_{(1,28)} = 4,169$, $p = 0,0507$. Para SR CA3: factor OVX: $F_{(1,28)} = 1,746$, $p = 0,1971$; factor STZ: $F_{(1,28)} = 9,864$, $p = 0,0040$; interacción: $F_{(1,28)} = 3,962$, $p = 0,0564$. Para SR CA1: factor OVX $F_{(1,28)} = 3,137$, $p = 0,0874$; factor STZ: $F_{(1,28)} = 18,82$, $p = 0,0002$; interacción: $F_{(1,28)} = 8.859$, $p = 0,0060$).

Por lo tanto, nuestros resultados muestran que la respuesta de la microglía fue conservada en las tres regiones hipocámpicas, y sugieren que microglía responde a la STZ proliferando solo en ratas con una depleción de hormonas ováricas, mientras que la reactividad de estas células aumenta por inyección de STZ independientemente del estado ovárico del animal.

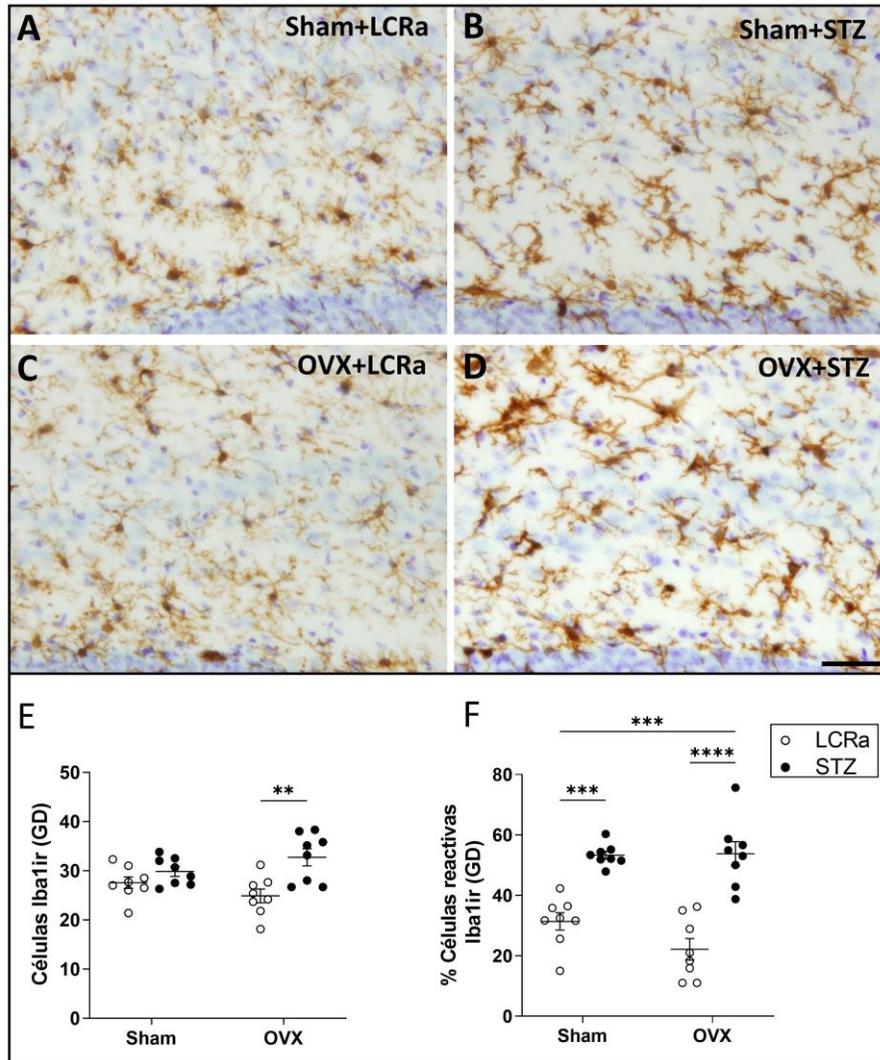


Figura 55: Respuesta de la microglía a la inyección de STZ en ratas con y sin ovarios, en el GD. Secciones coronales del GD con IHQ para Iba1, representativas de cada grupo experimental; barra de escala: 40 μ m (A-D). La inyección de STZ en ratas sin ovarios provocó un aumento de las células microgliales (E). Simultáneamente, la STZ aumentó la proporción de células reactivas, tanto en animales con y sin ovarios (F). Los datos se analizaron mediante ANOVA de dos factores y se representaron como media \pm SEM. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

6.3 Discusión del efecto de STZ-icv en ratas hembra

La EA afecta desproporcionadamente a las mujeres en comparación con los hombres (L. L. Barnes et al., 2005; Beam et al., 2018; S. Gao et al., 1998; Gaugler et al., 2023), ya que aproximadamente dos tercios de los pacientes son mujeres. Sin embargo, los mecanismos biológicos que subyacen a esta diferencia siguen siendo en gran medida desconocidos. Probablemente esto se deba a que, por muchos años, los animales macho fueron elegidos principalmente como modelo en neurociencia, retrasando el

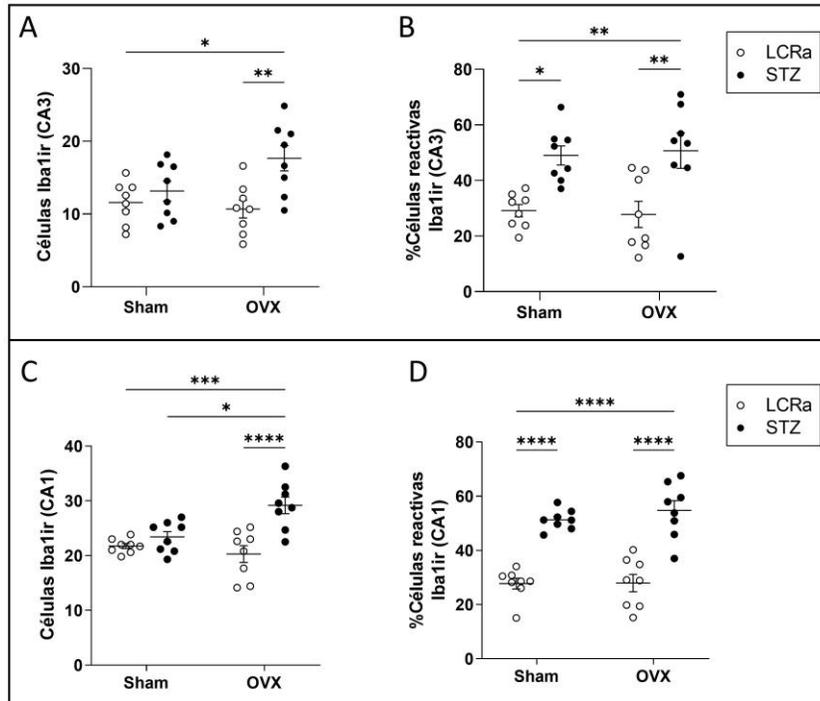


Figura 56: Respuesta de la microglía a la inyección de STZ en ratas con y sin ovarios, en CA3 y CA1. La inyección de STZ en ratas sin ovarios provocó un aumento de las células microgliales en CA3 (A) y en CA1 (C). Al igual que en GD, en ambas regiones la STZ aumentó la proporción de células reactivas, tanto en animales con y sin ovarios (B y D). Los datos se analizaron mediante ANOVA de dos factores y se representaron como media \pm SEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

conocimiento acerca de la patología en el cerebro de la hembra. Este también es el caso para el modelo de STZ-icv, que si bien fue descrito en la década de los 90 (Lannert & Hoyer, 1998), actualmente solo unos pocos trabajos utilizaron ratas hembra inyectadas con STZ (Biasibetti et al., 2017; Dalli et al., 2018; Misra et al., 2011). El estudio del efecto de la STZ en las hembras sigue estando en gran medida incompleto. Por lo tanto, consideramos que es necesaria una caracterización exhaustiva para definir las condiciones en las que la STZ podría ser utilizada para generar un modelo de EAe en hembras. Por esta razón, hemos decidido estudiar el efecto de una única inyección bilateral de STZ en dosis de 3mg/kg de peso corporal, dosis utilizada por nosotros y otros autores para generar el modelo en ratas macho (Bassani et al., 2018; Knezovic et al., 2015; Zappa Villar et al., 2018, 2020, 2021). En este trabajo, utilizamos animales con y sin ovarios, para evaluar si la depleción de esteroides gonadales podría cambiar la vulnerabilidad de las ratas a la STZ.

En primer lugar, la STZ generó un descenso del peso corporal de los animales, hasta 8 días post inyección, tal como hemos observado previamente en ratas macho (Zappa Villar et al., 2018). Por otro lado, la ovariectomía produjo un aumento en la ganancia de peso de los animales respecto al control, lo cual es un fenómeno esperado debido a la reducción de esteroides ováricos en circulación. Efectivamente, la menopausia en mujeres está asociada con un incremento en la grasa corporal (Ley et al., 1992). En animales, la ovariectomía genera un incremento en el consumo de alimento y un incremento en la grasa corporal (Y. Chen & Heiman, 2001; McElroy & Wade, 1987). La resistencia a leptina no parecería estar involucrada en este proceso (Y. Chen & Heiman, 2001), sin embargo, un mecanismo posible mediante el

cual los esteroides afectarían el metabolismo del tejido adiposo sería a través de la actividad de la lipasa lipoproteica, ya que se ha demostrado que la ovariectomía duplica la actividad de esta enzima, que puede ser revertido por tratamiento con estradiol (Hamosh & Hamosh, 1975).

Resulta interesante observar que, en hembras con ovarios, la STZ no produjo una baja significativa del enterramiento de canicas. La interpretación de estos resultados debe ser cautelosa, ya que el enterramiento natural de objetos que no representan un peligro para el animal ha sido mayoritariamente estudiado en ratas macho (de Brouwer et al., 2019), y es necesario considerar la posibilidad de que este comportamiento tenga una interpretación diferente según el sexo del animal. Además, en ratas hembra ciclando, hemos observado una alta dispersión por grupo, lo cual podría ser consecuencia de las variaciones hormonales del ciclo estral. Efectivamente, un trabajo realizado en hembras Wistar sugiere que los estrógenos y la progesterona podrían influir en el comportamiento de enterramiento. Mas específicamente, se ha observado que durante la fase proestro, cuando los niveles plasmáticos de estradiol son altos, el enterramiento de canicas es pobre, comparado a la fase temprana del metestro, cuando los niveles hormonales son bajos (T. Schneider & Popik, 2007). Teniendo en cuenta estas observaciones, creemos necesario, en futuros estudios, aumentar el número de animales para evaluar este comportamiento en distintas etapas del ciclo estral. En cuanto a las ratas sin ovarios, la STZ sí produjo un descenso del enterramiento de canicas, de manera similar a lo reportado previamente por nuestro grupo en ratas macho (Zappa Villar et al., 2020, 2021). Desafortunadamente, la falta de estudios en ratas hembra sobre este tipo de comportamiento dificulta la interpretación de los resultados, por lo que es necesario realizar más estudios para comprender la naturaleza de esta conducta.

Respecto al comportamiento exploratorio, se observó que el efecto de la STZ está influenciado por las hormonas ováricas, ya que la droga lo redujo en las ratas con ovarios, no así en las OVX. Por otro lado, la STZ aumentó la ansiedad de los animales independientemente del estatus ovárico de los mismos. La exploración de un entorno nuevo es una tendencia natural de los roedores, y este cambio también se reprodujo previamente en ratas macho (Zappa Villar et al., 2020).

En cuanto a la memoria, la STZ indujo un marcado deterioro de la memoria de reconocimiento, independientemente del estado ovárico de los animales, estudiada tanto a corto como a largo plazo (90 min y 24 h de retención, respectivamente). Este tipo de memoria, evaluada mediante el paradigma RO, se muestra particularmente vulnerable a los efectos de la STZ desde tiempos cortos post inyección, ya que también se encuentra afectada en ratas macho del modelo, luego de aproximadamente 20 días de la administración de la droga (Zappa Villar et al., 2018, 2021). Por otro lado, la ovariectomía solo afectó a la memoria de reconocimiento de largo plazo. Nuestros resultados concuerdan con lo reportado previamente para el test RO en ratas Wistar OVX, en los cuales se observó un deterioro de la memoria de largo pero no de corto plazo, a partir de 2 semanas post ovariectomía (Djiogue et al., 2018). Sin embargo, en lo que respecta a la memoria espacial, no se observó un efecto tan marcado de la STZ como lo hemos reportado previamente por nuestro grupo mediante el LB (Zappa Villar et al., 2018, 2020, 2021) y, por otros grupos mediante diferentes test como el MWM, el test de locación de objetos, y el Y-maze (Bassani et al., 2018; Grünblatt et al., 2007; Shoham et al., 2003, 2007). Cabe mencionar que, agrupando los animales con STZ, observamos una disminución del número de exploraciones totales durante el PT del laberinto, aunque esto no representa una medida de memoria espacial, sino más bien es interpretado como una disminución de motivación y de exploración.

Por último, en el NF, tanto la administración de STZ como la ovariectomía generaron resultados conforme a lo esperado. La STZ disminuyó el comportamiento activo como fue observado previamente en machos. De manera similar, la ovariectomía también redujo este comportamiento y aumentó el tiempo de inmovilidad, lo cual concuerda con estudios previos que han señalado que induce comportamiento similar a la depresión (Al-Rahbi et al., 2013; Da Silva Moreira et al., 2016). Además, estudios longitudinales han demostrado una asociación entre la transición a la menopausia y un aumento de los síntomas depresivos en las mujeres (Schmidt et al., 2015; Vivian-Taylor & Hickey, 2014; Whooley et al., 2000).

Como se mencionó previamente, el hipocampo representa una estructura cerebral pivotal afectada en pacientes que padecen EA (Jack et al., 2011; L. Su et al., 2018). Varios trabajos, incluidos los nuestros, han demostrado el impacto de la STZ-icv en el hipocampo de ratas macho sobre proteínas relevantes para la EA, como la acumulación anormal del péptido β A y la elevada proporción de proteína Tau en su forma fosforilada (Afshar et al., 2018; Grünblatt et al., 2007; Guo et al., 2017; Y. Lu et al., 2017; Salkovic-Petrisic & Hoyer, 2007; Zappa Villar et al., 2018, 2021). Sin embargo, hasta la fecha sólo existe un estudio que demuestre el efecto de la STZ sobre estas proteínas clave utilizando ratas hembra (Bao et al., 2017). En concordancia con este trabajo previo, nuestros hallazgos sugieren que las ratas hembra exhiben una mayor resiliencia frente a la neurotoxicidad inducida por STZ en comparación a los machos, ya que la droga no tuvo un efecto significativo sobre los niveles del péptido β A ni en las fosforilaciones de Tau evaluadas (Thr231 y Ser396). Adicionalmente, nuestro estudio indica que el impacto de la STZ sobre proteínas marcadoras de la EA no se modifica por el estado ovárico de los animales.

Previamente, nuestro grupo y otros equipos de investigación, demostramos que el modelo de STZ-icv en ratas macho se ve caracterizado por un aumento de la reactividad de la microglía en áreas relevantes para la EA, como el hipocampo (Bassani et al., 2018; Shoham et al., 2007; Zappa Villar et al., 2018, 2020, 2021). Sin embargo, la modulación de la reactividad glial por el sexo y los esteroides ováricos aún no está del todo esclarecida. Debido a que la población microglial presenta heterogeneidad entre distintas zonas del SNC y también diferencias intra-regionales (Tan et al., 2020), nos pareció relevante evaluar el efecto de la STZ en ratas con y sin ovarios en tres regiones distintas del hipocampo, el GD y el SR de CA1 y de CA3. Nuestros resultados muestran que la STZ no aumentó el número de células Iba1-ir en ratas hembra con ovarios, en ninguna de las tres regiones analizadas. Por el contrario, en el **Capítulo IV** demostramos que en machos inyectados con STZ, la microglía del SR de CA1 responde aumentando su número, lo que sugiere que la droga no tiene el mismo efecto en machos y hembras (ciclando), con respecto a la proliferación microglial.

Curiosamente, la STZ en los animales sin ovarios produjo un aumento significativo de la microglía en las regiones analizadas. Resultados similares a los nuestros, pero en la corteza prefrontal de ratas SD OVX a los dos meses de edad, mostraron que ocho semanas post cirugía, no se observaron cambios en el número de células microgliales ni tampoco en el número de microglía que expresa iNOS, como marcador de microglía reactiva proinflamatoria (Ge et al., 2020). En dicho trabajo, se indujo estrés crónico en ratas hembra con y sin ovarios, y el aumento del número de microglía total, así como el aumento del fenotipo proinflamatorio, solo se observó en el grupo que combinaba la ovariectomía con el tratamiento estresante. Por otro lado, otros trabajos sí muestran un efecto significativo de la ovariectomía en la reacción microglial, pero en ratas de mediana edad (13 meses de edad) (Sarvari et al., 2012; Sárvári et al., 2014). Por lo tanto, es posible que, utilizando ratas de mayor edad, o estudiándolas a un tiempo mayor post ovariectomía, los efectos de la baja de hormonas ováricas en circulación, sean más evidentes a nivel cerebral.

En cuanto al fenotipo de la microglía, en ratas con ovarios, las células respondieron a la STZ de forma similar a lo reportado en ratas macho, ya que observamos un aumento de su reactividad. Adicionalmente, observamos que la respuesta a la STZ fue equivalente en ratas con y sin ovarios, y comparable entre las tres regiones analizadas. Hasta ahora, no es de nuestro conocimiento que se hayan publicado trabajos evaluando la reacción de la microglía a la STZ en ratas hembra, lo cual resalta la importancia de nuestros resultados.

Por otro lado, evaluamos las neuronas maduras e inmaduras del GD, para evaluar si la STZ promovía neurodegeneración y disminución de neurogénesis, como es comúnmente observado en ratas macho. Nuestros resultados demuestran que la STZ afectó las neuronas maduras de la capa granular del GD, una respuesta que fue independiente de los niveles hormonales en circulación. Aunque el efecto de la STZ en el GD en ratas hembra no ha sido evaluado en otros trabajos, una publicación reporta que la misma dosis de STZ causa neurodegeneración luego de 21 días, en las neuronas maduras de la capa piramidal de CA1 (Dalli et al., 2018), comparable a lo que hemos demostrado previamente en ratas macho inyectadas con STZ-icv (Zappa Villar et al., 2021).

Al evaluar las neuronas inmaduras de la SGZ del GD, zona neurogénica del hipocampo, observamos que la STZ tuvo un efecto negativo muy marcado en las células DCX-ir, lo que sugiere una disminución de la neurogénesis, tal como se ha reportado previamente para ratas macho, tanto a corto como a largo plazo post inyección (Zappa Villar et al., 2020, 2021). Específicamente, utilizando marcadores de proliferación y diferenciación celular como BrdU y Ki-67, otros grupos también trabajando en machos, demostraron que el crecimiento de nuevas neuronas se ve afectado por la STZ, lo cual es asociado por estos autores al estrés oxidativo causado por la STZ y a los mediadores inflamatorios liberados por las células gliales reactivas (Bassani et al., 2018; Qu et al., 2012). Adicionalmente, observamos que la administración de STZ en animales sin ovarios tuvo un mayor impacto sobre las células DCX, disminuyéndolas aún más, respecto al grupo de hembras inyectadas con STZ pero con ovarios. Los efectos neuroprotectores y neurotróficos de los estrógenos han sido investigados por múltiples grupos de investigación. Los estrógenos, pueden mediar estas acciones a través de vías genómicas y no genómicas, por la expresión de diversos tipos de receptores en el SNC. Estas hormonas, son esenciales para mantener el equilibrio entre la proliferación y la diferenciación de las células madre/progenitoras neurales (NSPC) embrionarias y adultas, modulando así los procesos neurogénicos. Efectivamente, los receptores de estrógeno clásicos (ER α y ER β) y no clásicos (GPER-1) son expresados por las NSPC (Waldron et al., 2010; L. Zhang et al., 2019). Por lo tanto, es posible que la depleción de hormonas esteroideas, causada por la ovariectomía, haya vuelto a las NSPC del hipocampo más vulnerables a la acción de la STZ en las ratas sin ovarios.

6.4 Resultados de la evaluación de diferencias sexuales en el modelo de STZ-icv

6.4.1 Diferencias sexuales en la memoria por inyección de STZ-icv

Para poder realizar una comparación del efecto de la STZ entre las ratas macho y hembra, se llevó a cabo un experimento incluyendo seis grupos experimentales en simultáneo: machos LCRa, machos STZ, hembras LCRa, hembras STZ, OVX+LCRa, OVX+STZ. Los animales fueron controlados por su peso corporal periódicamente, y al igual que lo reportado previamente, tanto machos como hembras inyectadas con STZ disminuyeron su peso corporal durante la primera semana post inyección, tiempo después del cual comenzaron a recuperarlo (datos no mostrados). A su vez, como era esperado, la ovariectomía incrementó la ganancia de peso comparado a las ratas hembra con ovarios (datos no mostrados). Hacia el final del experimento, y durante los test comportamentales, no se observaron diferencias significativas en peso corporal entre animales inyectados con LCRa y STZ.

En el test de MB, los machos STZ enterraron significativamente menos canicas que el grupo control, mostrando el comportamiento típico de especie afectado en este modelo (**Fig. 57**). Si bien el grupo STZ de machos no difirió significativamente de los grupos de hembras igualmente tratados, las hembras STZ con ovarios no mostraron una reducción en el enterramiento comparado con su control Sham. Curiosamente, la inyección de STZ en ratas sin ovarios provocó una reducción de este comportamiento (**Fig. 57**) (ANOVA de dos factores de datos transformados logarítmicamente; factor sexo: $F_{(2, 37)} = 2,146$, $p = 0,1313$; factor STZ: $F_{(1, 37)} = 20,58$, $p < 0,0001$; interacción: $F_{(2, 37)} = 1,936$, $p = 0,1586$).

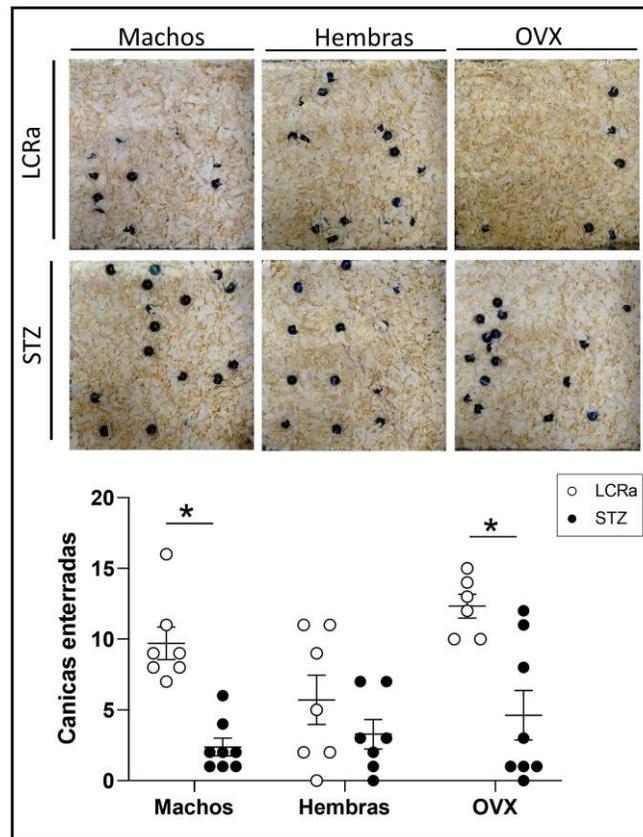


Figura 57: Comportamiento típico de especie afectado por STZ-icv en machos y en ratas ovariectomizadas. Arriba: Fotografías representativas de cada grupo experimental, del resultado del test de MB. Abajo: La cuantificación de canicas enterradas mostró una disminución significativa en los machos STZ y en las hembras OVX+STZ.

A través del LB, encontramos que la memoria espacial se encuentra afectada en los machos con STZ ya que mostraron un aumento en la latencia para encontrar la caja de escape comparado con su grupo control, y este aumento fue también mayor comparado con los grupos de hembras tratados con STZ (**Fig. 58A**) (ANOVA de dos factores; factor sexo: $F_{(2, 37)} = 8,601$, $p=0,0009$; factor STZ: $F_{(1, 37)} = 11,04$, $p=0,0020$; interacción: $F_{(2, 37)} = 3,537$, $p=0,0393$). Adicionalmente, los machos STZ mostraron una disminución en las exploraciones del GS versus los machos Sham y las hembras OVX+STZ (**Fig. 58B, C**) (ANOVA de dos factores; factor sexo: $F_{(2, 37)} = 1,990$, $p=0,1510$; factor STZ: $F_{(1, 37)} = 3,368$, $p=0,0745$; interacción: $F_{(2, 37)} = 3,300$, $p=0,0480$). Si bien no se encontraron diferencias entre los grupos de hembras, en la latencia, el análisis de los efectos principales que surge de la comparación de los cuatro grupos de hembras, mostró ser significativo para el factor STZ (Factor STZ: $p=0,0131$; interacción de factores: $p>0,05$), lo que indica que la STZ afectó la memoria espacial de las hembras, aunque en menor medida que la de los machos.

En cuanto al comportamiento símil depresión, los machos con STZ mostraron las alteraciones esperadas, es decir, disminución en la conducta activa (**Fig. 58D**) (ANOVA de dos factores; factor sexo: $F_{(2, 37)} = 11,22$, $p=0,0002$; factor STZ: $F_{(1, 37)} = 23,04$, $p<0,0001$; interacción: $F_{(2, 37)} = 1,947$, $p=0,1571$) y una fuerte tendencia a aumento en la inmovilidad (**Fig. 58E**). Como mencionamos anteriormente, tanto la STZ como la ovariectomía afectan al comportamiento tipo depresivo, ya que ambas intervenciones aumentan el tiempo de inmovilidad (**Fig. 58E**) (ANOVA de dos factores; factor sexo: $F_{(2, 37)} = 13,32$, $p<0,0001$; factor STZ: $F_{(1, 37)} = 27,13$, $p<0,0001$; interacción: $F_{(2, 37)} = 2,121$, $p=0,1343$). En consideración con la **figura 52**, nuestros resultados sugieren que la STZ-icv tiene un efecto sobre este comportamiento en hembras similar al observado en machos.

En conclusión, la inyección de STZ afecta diversas facetas del comportamiento de las ratas macho, específicamente el comportamiento típico de especie, la memoria espacial y el comportamiento símil depresión. Aunque para las ratas hembra inyectadas con STZ-icv se observaron tendencias en la misma dirección que para las ratas macho, en general, este efecto no es significativo cuando se compararan los seis grupos experimentales. Sin embargo, en todos los casos el análisis de los efectos principales mostró que globalmente, la STZ afecta a los animales en los comportamientos evaluados.

6.4.2 La STZ afecta a las neuronas inmaduras independientemente del sexo

Anteriormente hemos reportado que la STZ-icv disminuye fuertemente el número de neuronas inmaduras del GD positivas para DCX, tanto en ratas macho como en hembras. Con el fin de confirmar estos resultados y poder compararlos entre machos y hembras, estudiamos la expresión de otro marcador de neuronas inmaduras, la molécula de adhesión de células neurales polisialiladas (PSA-NCAM), una de las primeras moléculas utilizadas en estudios sobre la plasticidad estructural del SNC, incluida la neurogénesis adulta (Bonfanti & Seki, 2021). En coherencia con lo observado para DCX, nuestros resultados demostraron que la STZ disminuyó drásticamente el número de neuronas PSA-NCAM positivas del GD, independientemente del sexo y del estado ovárico de los animales (**Fig. 59G**), corroborando el efecto de la STZ-icv sobre las neuronas inmaduras (ANOVA de dos factores de datos transformados con raíz cuadrada; factor sexo: $F_{(2, 27)} = 2,647$, $p= 0,0892$; factor STZ: $F_{(1, 27)} = 146,8$, $p=<0,0001$; interacción: $F_{(2, 27)} = 2,844$, $p=0,0757$).

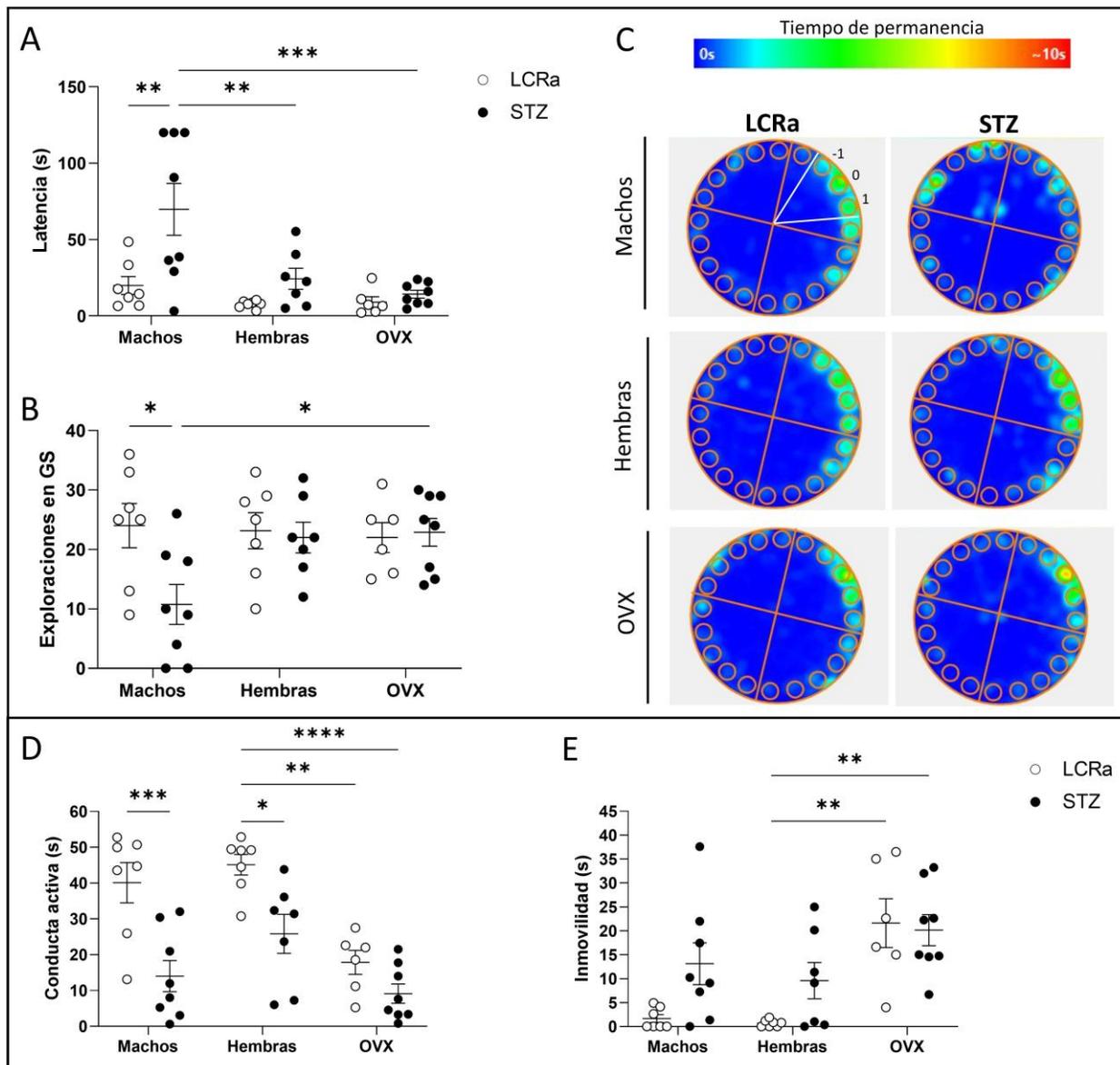


Figura 58: Diferencias sexuales en el deterioro de memoria espacial inducido por STZ-icv y comportamiento símil depresivo en todos los grupos tras la inyección de STZ. La latencia en el PT del LB muestra que los machos STZ están afectados comparados a su control y a los grupos de hembras inyectadas por STZ (A); resultado similar para las exploraciones en el GS (B). Mapas de calor representativos de cada grupo experimental, mostrando los sitios más explorados de la plataforma del LB (C). En el FTS, los machos STZ tuvieron una menor motivación de escape que el control, y una tendencia similar se observó en las ratas hembra con ovarios, haciéndose significativa en ratas ovariectomizadas, respecto al control (D); se observó una tendencia a aumentar el tiempo de inmovilidad para ratas macho y hembras con ovarios inyectados con STZ, y por otro lado la ovariectomía aumentó el comportamiento tipo depresivo (E). Los datos se analizaron mediante ANOVA de dos factores y se representaron como media \pm SEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

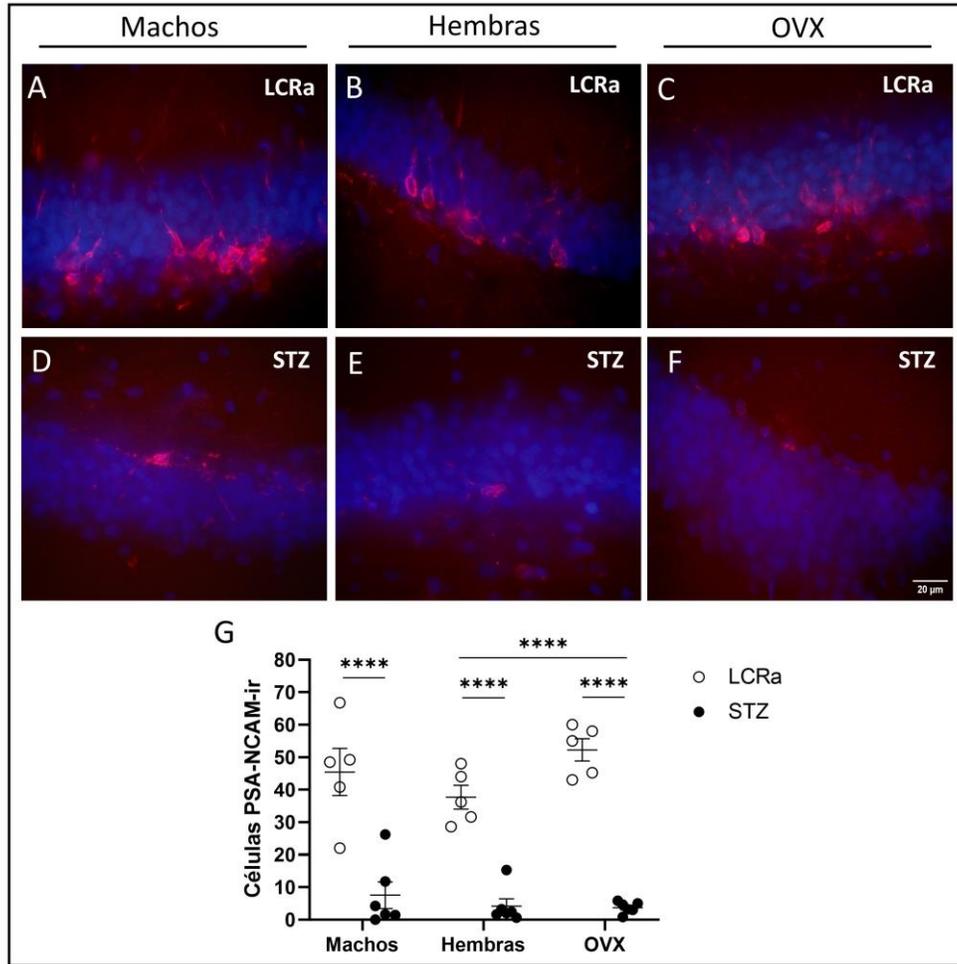


Figura 59: La STZ-icv disminuye el número de células PSA-NCAM-ir en el GD del hipocampo. La STZ afectó fuertemente la población neuronal que expresa PSA-NCAM en ratas de ambos sexos y en hembras sin ovarios (G). Imágenes representativas de cada grupo experimental con IHQ para PSA-NCAM (magenta) y tinción de núcleos con DAPI (azul) (A-F). Barra de escala: 20 μ m (D-I). Los datos se analizaron mediante ANOVA de dos factores y se representaron como media \pm SEM. ****p < 0,0001.

6.4.3 Reactividad de los astrocitos por inyección de STZ-icv en machos y hembras

6.4.3.1 Aumento de la reactividad de astrocitos por STZ-icv, de manera dependiente de la región hipocámpal, en machos pero no en hembras

Se cuantificó la intensidad de fluorescencia de GFAP en tres regiones distintas del hipocampo: CA3, CA1 y GD (Fig. 60D). Para los machos tratados con STZ, se observó en los mosaicos de imágenes, un aumento generalizado de GFAP en el hipocampo (Fig. 60D y E), el cual fue significativo comparado al control en la región CA3 (Fig. 60A) (ANOVA de dos factores; factor sexo: $F_{(2, 27)} = 1,227$, $p = 0,3090$; factor STZ: $F_{(1, 27)} = 4.649$, $p = 0,0401$; interacción: $F_{(2, 27)} = 2,728$, $p = .0834$). En las regiones de CA1 (Fig. 60B) y GD (Fig. 60C), si bien se observa una tendencia a aumentar la expresión de GFAP, esta diferencia no alcanzó a ser significativa. Por el contrario, no se observaron diferencias significativas entre los grupos de hembras. Estos resultados muestran que la respuesta de los astrocitos a la STZ en términos de cambios de expresión de GFAP, es dependiente del sexo, al menos al corto plazo. Adicionalmente estos resultados muestran que

la susceptibilidad de los astrocitos a la STZ puede variar según la región hipocampal de la que formen parte.

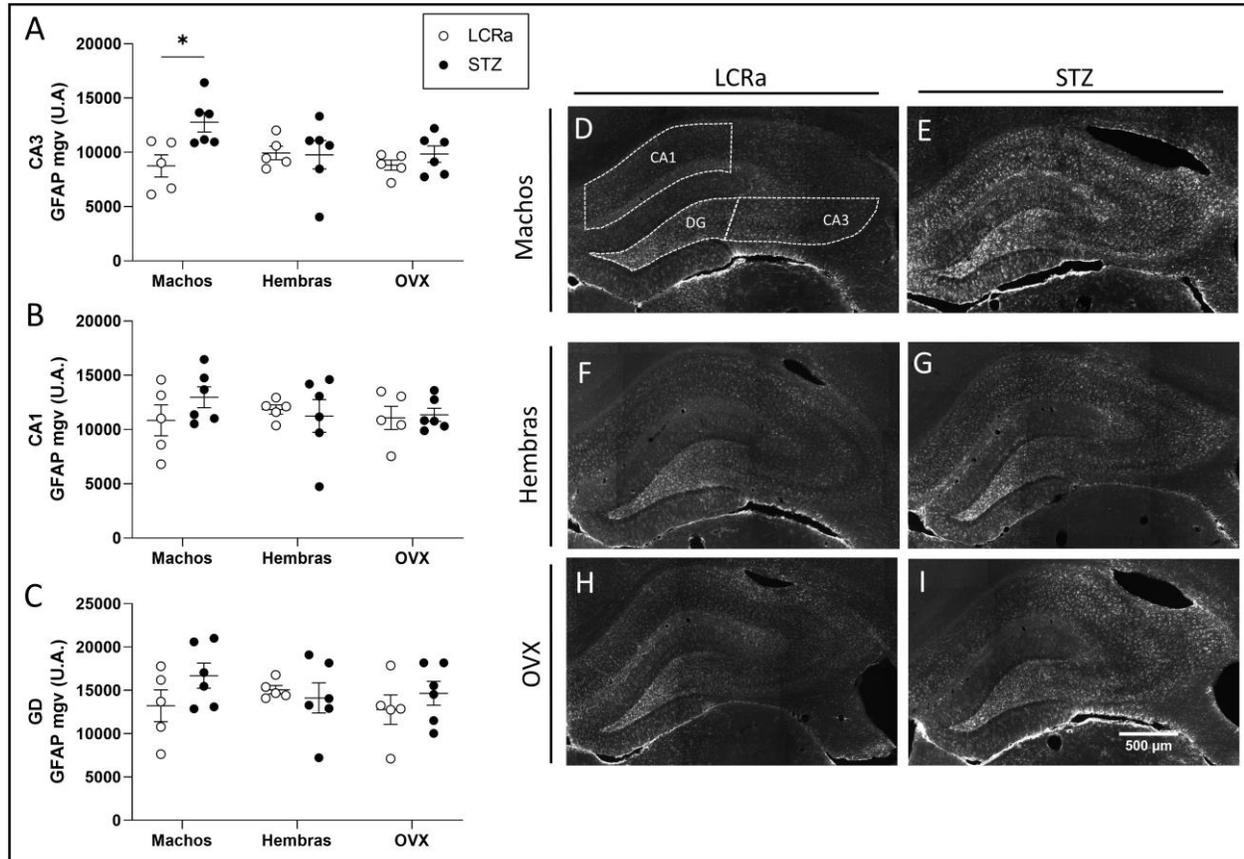


Figura 60: **Diferencias sexuales y regionales en la reactividad astrocítica inducida por STZ-icv.** El incremento de expresión de GFAP fue significativo en machos tratados con STZ en la región CA3 del hipocampo (A), pero no en CA1 (B) ni tampoco en el GD (C). Mosaicos de corte coronal de hipocampo, con IHQ para GFAP; barra de escala: 500 µm (D-I). mgv: media de valor de grises (*mean gray value*); U.A.: unidades arbitrarias. Los datos se analizaron mediante ANOVA de dos factores y se representaron como media ± SEM. * $p < 0,05$.

6.4.3.2 Activación de la cascada de señalización de JAK2/STAT3 por STZ-icv en machos pero no en hembras

La cascada de JAK2/STAT3 es una de las principales vías que induce la reactividad de los astrocitos (**sección 1.1.5.3, astrocitos**). Para analizar si esta cascada de señalización se encontraba activada en los astrocitos de este modelo de EAe, se cuantificó la expresión de STAT3 en el núcleo de astrocitos GFAP-ir. Debido a que STAT3 al ser activado migra hacia el núcleo donde actúa como factor de transcripción, esta medida sirve para evaluar la activación de la vía de señalización. En concordancia con los resultados obtenidos para la expresión de GFAP, los machos con STZ mostraron un aumento de expresión de STAT3 en CA3 (**Fig. 61A-H; Fig 62A, D-I**) (ANOVA de dos factores; factor sexo: $F_{(2, 27)} = 0,7321$, $p = 0,4902$; factor STZ: $F_{(1, 27)} = 7,543$, $p = 0,0106$; interacción: $F_{(2, 27)} = 3,632$, $p = 0,0401$) y en el Hilus del GD (**Fig. 62C**) (ANOVA de dos factores; factor sexo: $F_{(2, 27)} = 0,05204$, $p = 0,9494$; factor STZ: $F_{(1, 27)} = 4,165$, $p = 0,0511$; interacción: $F_{(2, 27)} = 3,853$, $p = 0,0337$). Por el contrario, en CA1, no hubo diferencias significativas en la expresión de STAT3 nuclear entre los grupos de machos (**Fig. 62B**). En ratas hembra, la STZ no produjo cambios en los niveles

de STAT3 (**Fig. 61I-W; Fig. 62**). En conclusión, la cascada de JAK2/STAT3 se encuentra activada en el hipocampo de ratas macho tratadas con STZ, pero no en las ratas hembra, independientemente de su estado ovárico.

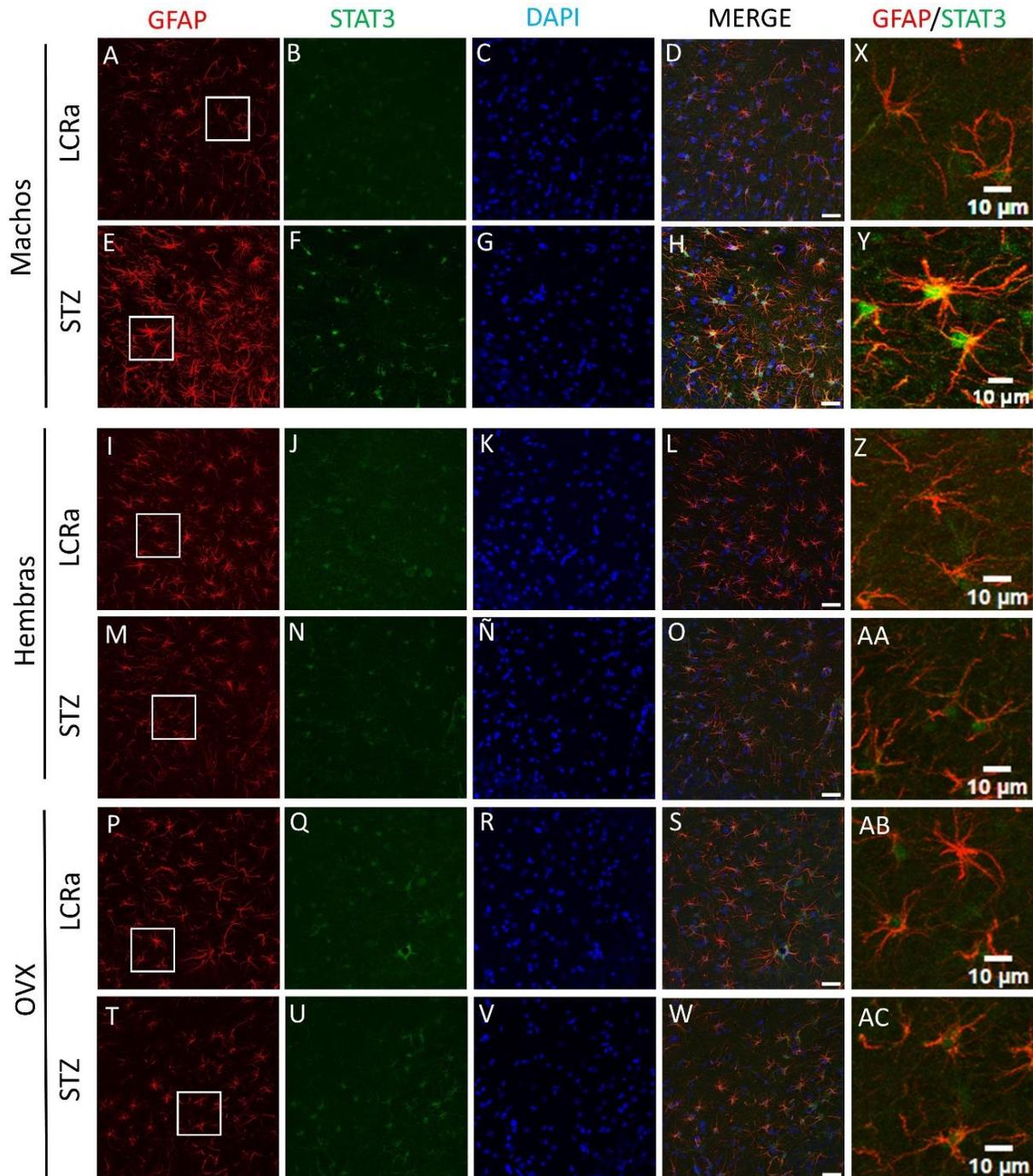


Figura 61: Diferencias sexuales en la activación de la vía de JAK2/STAT3 en astrocitos post inyección de STZ-icv. Proyecciones de máxima intensidad de imágenes confocales, representativas de cada grupo experimental, mostrando astrocitos marcados contra GFAP (rojo), STAT3 (verde) y DAPI (azul), en el *Stratum Lucidum* de CA3; barra de escala: 30μm (A-W). Detalle amplificado de astrocitos GFAP/STAT3, para cada grupo experimental (X-AC).

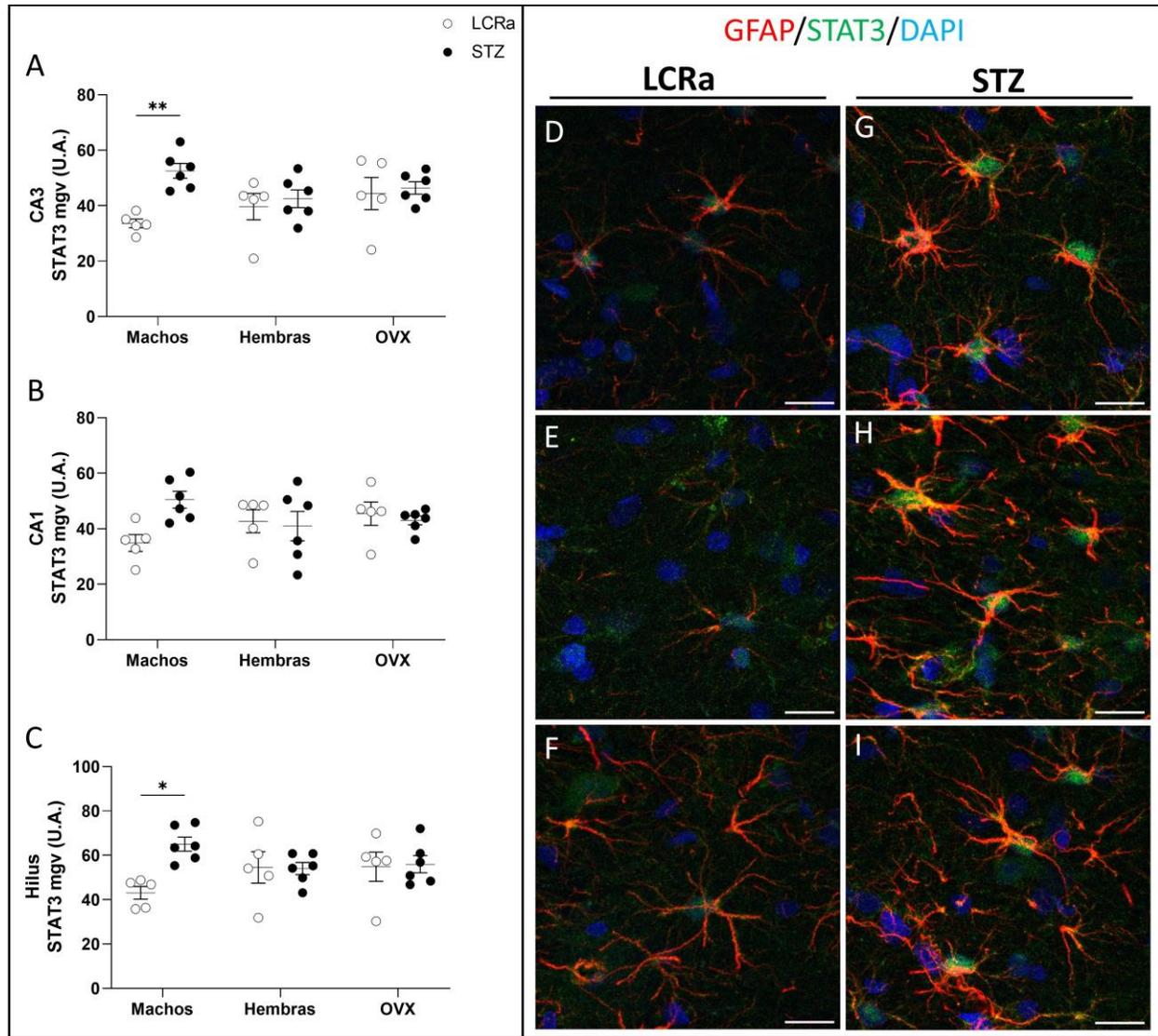


Figura 62: Activación de la vía de JAK2/STAT3 en astrocitos de ratas macho post inyección de STZ-icv. La STZ-icv provocó la activación de la vía JAK2/STAT3 en los astrocitos de la región del SL de CA3 (A), y en el hilus del GD (C), pero no en el SR de CA1 (B) en ratas macho. La STZ no generó cambios en ratas hembra. Los datos se analizaron mediante ANOVA de dos factores y se representaron como media \pm SEM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Proyecciones de máxima intensidad de imágenes obtenidas con microscopio confocal, mostrando astrocitos marcados contra GFAP (rojo), STAT3 (verde) y DAPI (azul), en el *Stratum Lucidum* de CA3 de ratas macho inyectadas con LCRa (D-F), o STZ (G-I); barra de escala: 15 μ m.

6.4.4 Diferencias sexuales en la pérdida de sinapsis hipocampales por STZ-icv

Debido a que los astrocitos contactan las sinapsis, y cambios en su reactividad puede afectar virtualmente todas sus funciones, cuantificamos el número de sinapsis enteras, es decir de colocalización entre un marcador pre-sináptico (Bassoon) y uno post-sináptico (Homer), en tres regiones diferentes del hipocampo, el *Stratum Lucidum* (SL) y *Radiatum* (SR) de CA3, y el Hilus del GD. Nuestros resultados muestran que el SL de CA3 posee las sinapsis más vulnerables a la STZ, ya que, únicamente en ratas machos, registramos una disminución de su número (Fig. 63A) (ANOVA de dos factores; factor sexo: $F_{(2, 27)} =$

5,356, $p=0,0110$; factor STZ: $F_{(1,27)}=0,1933$, $p=0,6637$; interacción: $F_{(2,27)}=8,633$, $p=0,0013$). En cambio, no se observaron diferencias en el SR de CA3 (**Fig. 63B**) y en el hilus (**Fig. 63C**), aunque si una tendencia a disminuir la sinapsis por inyección de la STZ en esta última región (t-test de Student $p=0,0500$). Por el contrario, no se observaron cambios entre los grupos de hembras, en ninguna de las tres regiones analizadas.

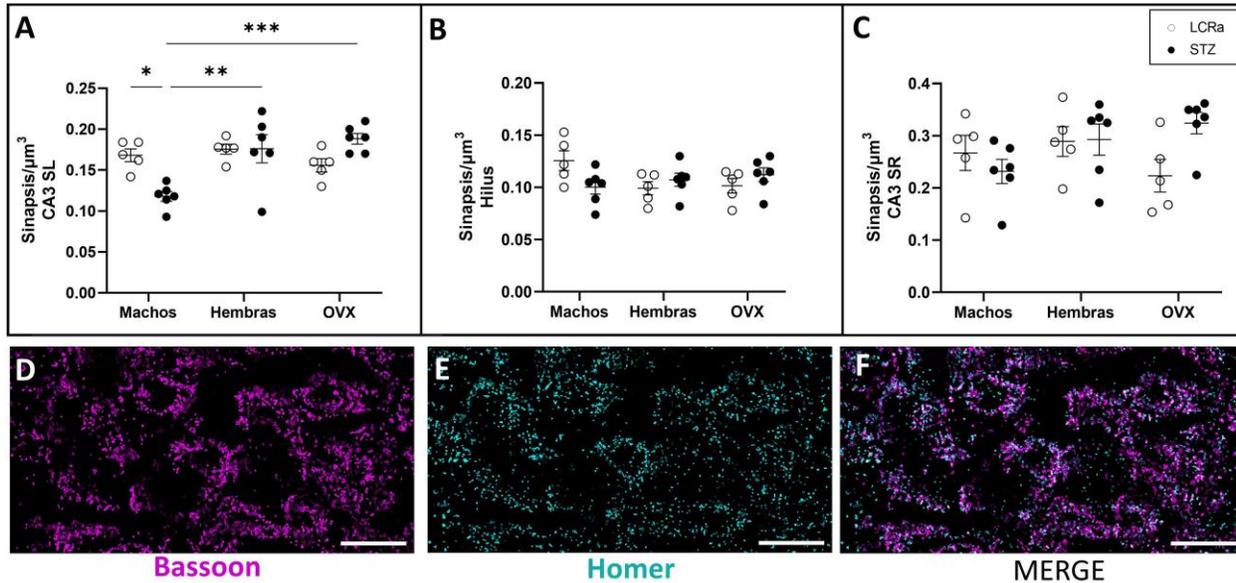


Figura 63: Diferencias sexuales y regionales en la pérdida de sinapsis inducida por STZ-icv. La STZ-icv provocó pérdida de sinapsis en la región del SL de CA3, en ratas macho tratadas con STZ, pero no hembras (**A**). No se registraron cambios en el SR de CA3 (**B**) ni tampoco en el Hilus del GD (**C**). Los datos se analizaron mediante ANOVA de dos factores y se representaron como media \pm SEM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Proyecciones de máxima intensidad de imágenes obtenidas en microscopio confocal, representativas de machos inyectados con LCRa (**D-F**), mostrando el marcaje para Bassoon (magenta) y Homer (cyan) en el SL de CA3. El análisis se realizó en 3D. Barra de escala: 10 μm .

6.4.5 La STZ-icv no afecta las proteínas astrocíticas Kir4.1 y GLT1

6.4.5.1 Expresión del canal de K^+ rectificador interno 4.1

El canal de K^+ rectificador interno (Kir) 4.1, se trata de un canal expresado principalmente en astrocitos, localizado en la membrana celular (**Fig. 65J**). Está implicado en varias funciones que incluyen la homeostasis del K^+ extracelular, el mantenimiento del potencial de membrana en reposo de los astrocitos, la regulación del volumen celular y la facilitación de la captación de glutamato (Bellot-Saez et al., 2017; Kucheryavykh et al., 2007; Méndez-González et al., 2020), lo cual es importante para las sinapsis. La inyección de STZ-icv no generó cambios significativos en la expresión de este canal en ninguna de las tres regiones evaluadas (CA3 en **Fig. 65A**, CA1 en **Fig. 65B**, y GD en **Fig. 65C**), independiente del sexo de los animales y del estado ovárico de las ratas hembra. Sin embargo, aunque el test post hoc no mostró diferencias significativas entre los grupos, en el GD, los efectos principales del test ANOVA mostraron que el factor STZ fue significativo (factor STZ: $F_{(1,27)}=9,139$, $p=0,0054$, interacción: $F_{(2,27)}=1,347$, $p=0,2769$), lo cual muestra que en los tres grupos tratados con STZ conjuntamente, la inyección de esta droga disminuye la expresión de Kir 4.1 comparado con los controles. En conclusión, a tiempo corto post inyección, la STZ-

icv no afecta la expresión de Kir4.1 en CA1 y CA3, aunque promueve una disminución de su expresión en el GD.

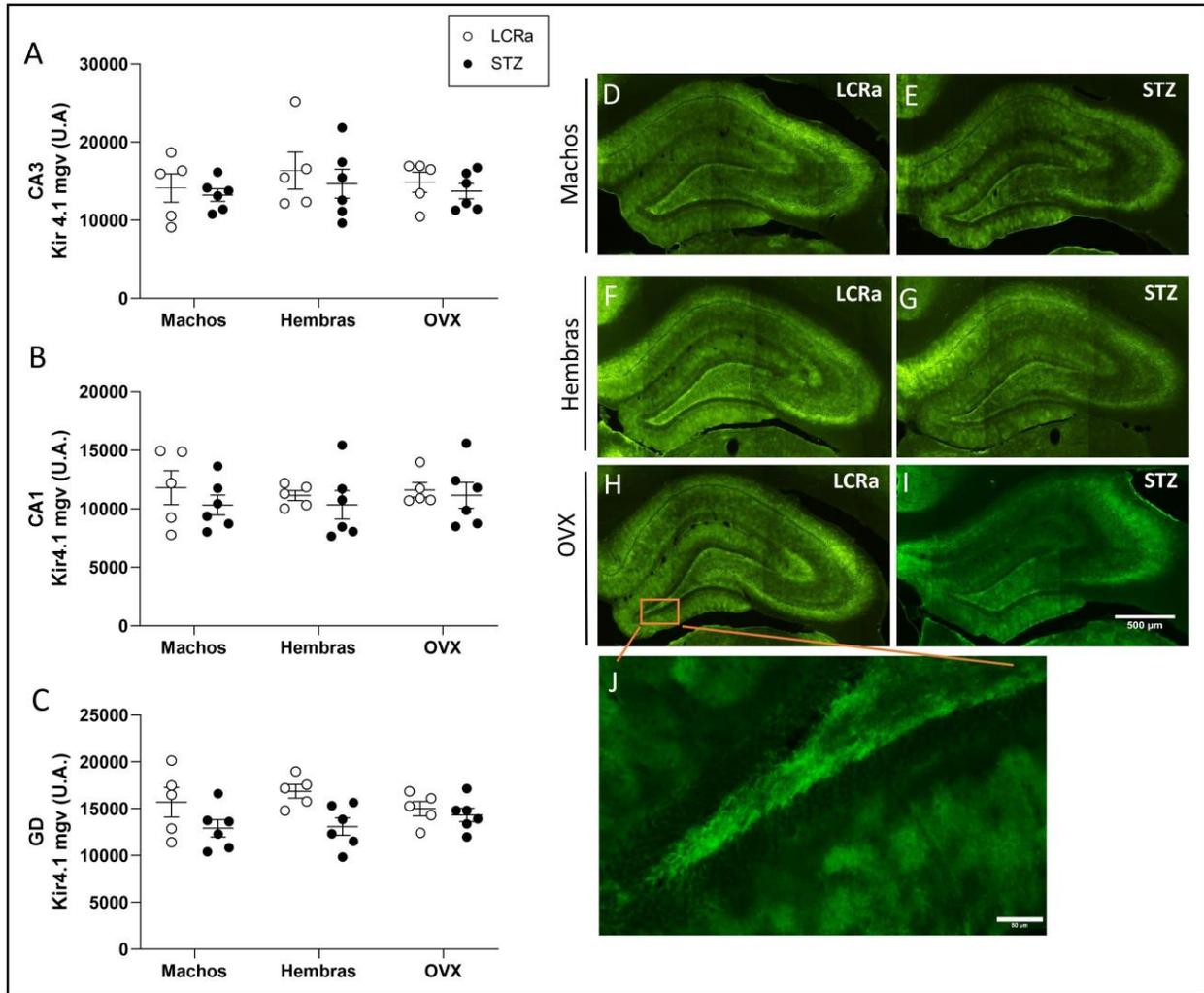


Figura 65: **Expresión de Kir 4.1 hipocampal en CA3, CA1 y el GD.** No se observaron diferencias en la expresión de Kir4.1 entre los seis grupos en la región CA3 del hipocampo (A) ni en CA1 (B), aunque en el GD el factor STZ disminuyó la expresión de Kir 4.1 (diferencia no mostrada gráficamente en (C)). Mosaicos de corte coronal del hipocampo, con IHQ para Kir4.1; barra de escala: 500 μm (D-I). Detalle del Hilus y la capa molecular que lo rodea mostrando astrocitos Kir4.1 positivos; barra de escala: 50 μm (J). mgv: media de valor de grises (*mean gray value*); U.A.: unidades arbitrarias. Los datos se analizaron mediante ANOVA de dos factores y se representaron como media ± SEM. *p < 0,05.

6.4.5.2 Expresión del transportador de glutamato 1

El transportador de glutamato 1 (GLT1) es el transportador más abundante en el cerebro, y es expresado por los astrocitos (Fig. 66J-L), que con el realizan captación de glutamato en la hendidura sináptica evitando así la excitotoxicidad en las neuronas por este neurotransmisor, y asegurando la fidelidad de eventos excitatorios posteriores (Andersen et al., 2021; Rothstein et al., 1994). La expresión de esta proteína no se vio afectada por la inyección de STZ ni la ovariectomía en ninguna de las tres

regiones hipocampales analizadas (**Fig. 66A-C**). Por lo tanto, la expresión de GLUT1 no se ve afectada por la inyección de STZ, independientemente del sexo y del estado ovárico de los animales.

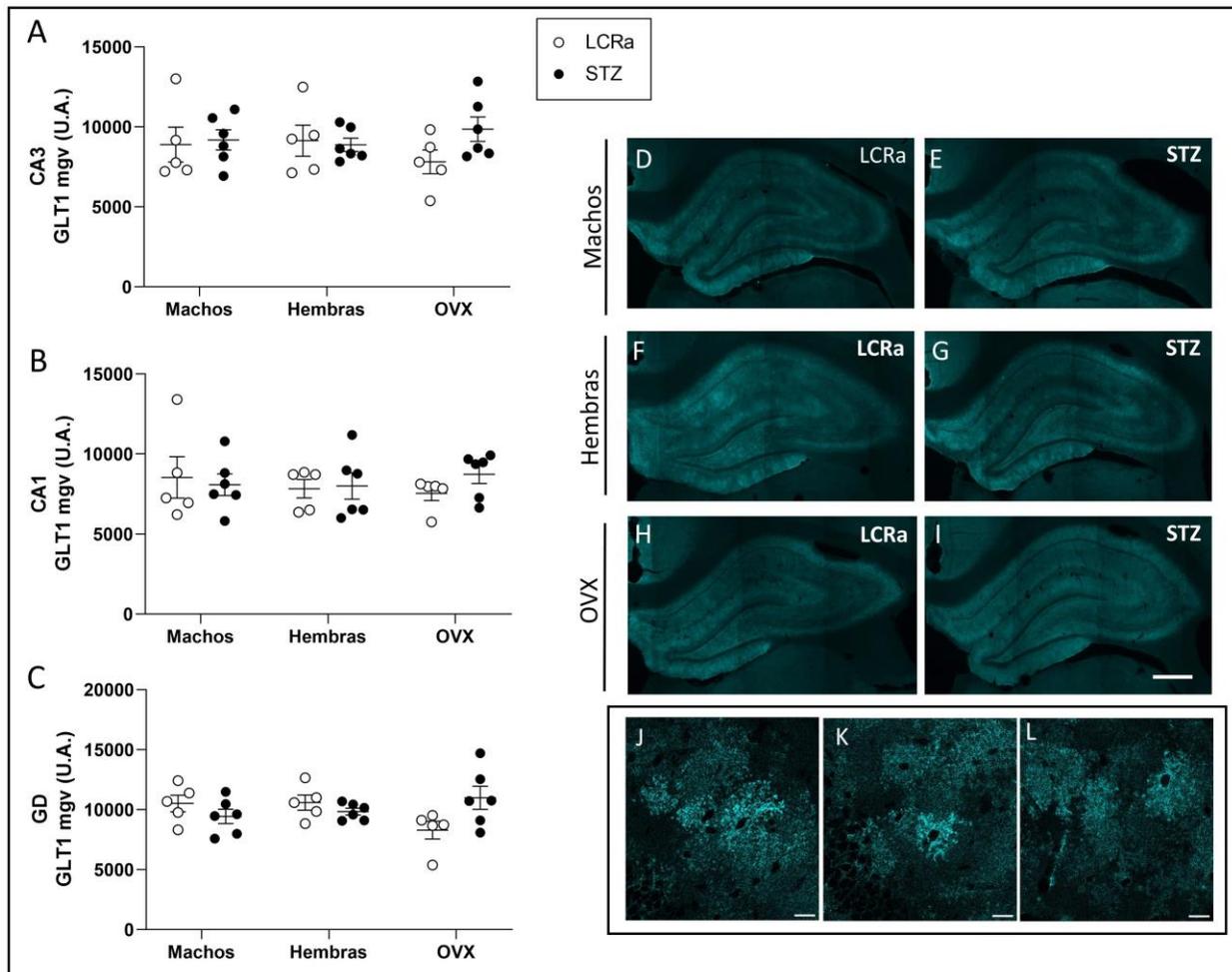


Figura 66: Expresión de GLUT1 hipocampal en CA3, CA1 y el GD. No se observaron diferencias en la expresión de GLUT1 entre los seis grupos en la región CA3 del hipocampo (A), en CA1 (B), ni en el GD (C). Mosaicos de corte coronal del hipocampo, con IHQ para Kir4.1; barra de escala: 500 μ m (D-I). Imágenes de confocal de alta magnificación (plano único) de la capa molecular del GD mostrando astrocitos GLUT1+; barra de escala: 20 μ m (J-L). mgv: media de valor de grises (*mean gray value*); U.A: unidades arbitrarias. Los datos se analizaron mediante ANOVA de dos factores y se representaron como media \pm SEM.

6.5 Discusión de las diferencias sexuales en el modelo de STZ-icv

Previamente, según fue descrito en este mismo capítulo, realizamos un experimento para caracterizar por primera vez los efectos de la STZ en ratas hembra. Curiosamente, en diversas variables de comportamiento, así como las obtenidas a partir del análisis de los cerebros, obtuvimos resultados diferentes a los esperados en referencia a las ratas macho. Principalmente, la falta de diferencia significativa entre ratas control y ratas STZ en algunos comportamientos, en la fosforilación de Tau y expresión del péptido β A, y proliferación microglial, nos llevaron a pensar que los efectos de la STZ son dependientes del sexo. Con el objetivo de continuar con la caracterización de la inyección icv de STZ en

ratas hembra y poder compararla con su efecto en machos, realizamos un experimento utilizando ratas de ambos sexos en simultáneo. El objetivo de este nuevo estudio fue centrarnos principalmente, además de en el comportamiento, en la reacción de los astrocitos a la STZ, ya que estas son células que desempeñan múltiples funciones clave de apoyo a las neuronas, y para las cuales aún no se cuenta con una caracterización profunda más allá de la expresión de GFAP, en este modelo de EAe.

En este experimento realizamos los test comportamentales de MB, LB y NF (previamente ya estudiados también en hembras), debido a que la STZ en machos afecta fuertemente los comportamientos evaluados mediante estas pruebas, y fue de interés comparar estas conductas entre animales de distinto sexo. Los resultados comportamentales que obtuvimos fueron reproducidos en experimentos previos, por lo tanto, en esta sección no se discutirá en detalle los resultados de estos test entre animales del mismo sexo, como ya fue discutido en los capítulos anteriores.

En primer lugar, en el MB observamos nuevamente que la STZ afecta el comportamiento típico de especie en los machos, pero en lo referido a las hembras, el efecto de la droga sucede en las ratas sin ovarios, y no así en las ratas ciclando, por lo que nuestros resultados indican que este comportamiento podría verse influenciado por los esteroides ováricos. En el LB, entre machos y hembras inyectados con vehículo no se observaron diferencias en la memoria espacial. Esto concuerda con lo reportado previamente para ratas de la misma edad que nuestros animales (cuatro meses de edad), evaluadas mediante el test de locación de objeto nuevo (Colettis et al., 2022). De manera interesante, en este trabajo se observó que, al cumplir el año de edad, la memoria espacial de los machos se encuentra deteriorada y no así la de las ratas hembra. Por otro lado, al evaluar la memoria espacial en este modelo de EAe, confirmamos que existen diferencias sexuales por inyección icv de STZ, ya que la droga afectó más a los machos que a las hembras. Por último, la STZ provocó un aumento de la conducta depresiva independientemente del sexo de los animales, y además observamos que el comportamiento similar depresivo se ve aumentado por la ovariectomía, de forma consistente con nuestros resultados previos, y en coherencia con lo reportado para mujeres durante la menopausia (Schmidt et al., 2015; Vivian-Taylor & Hickey, 2014; Whooley et al., 2000).

Anteriormente demostramos que la STZ disminuye fuertemente el número de neuronas inmaduras positivas para DCX de la zona neurogénica del hipocampo, tanto en machos como en hembras. Decidimos evaluar la expresión de PSA-NCAM, una proteína altamente enriquecida en muchas regiones del SNC durante la embriogénesis, que disminuye luego del nacimiento, y se expresa fundamentalmente en las regiones donde se producen la plasticidad y la neurogénesis en curso (Bonfanti & Seki, 2021). La expresión de PSA-NCAM se da en simultáneo con la de DCX, y nuestros resultados son consistentes con los anteriores, ya que observamos la STZ disminuye el número de neuronas inmaduras independientemente del sexo y del estado ovárico de los animales. Esto no solo puede tener implicancias para la neurogénesis del hipocampo, sino que PSA-NCAM también está involucrada en la diferenciación celular (Petridis et al., 2004; Röckle et al., 2008), y en otras formas de plasticidad, como la sinaptogénesis en el hipocampo (Dityatev et al., 2004; Seki & Rutishauser, 1998). Una disminución de PSA-NCAM en la zona subventricular, también una región neurogénica del cerebro fue observada en ratas macho tratadas con STZ (3mg/kg) luego de 3 meses post inyección (Voronkov et al., 2019). No encontrar diferencias entre sexos es tan importante como confirmar una, y nuestros resultados sobre marcadores de neuronas inmaduras, muestran que, en lo referido a la neurogénesis hipocampal en este contexto específico, sería viable

estudiar ratas de ambos sexos sin diferenciarlos. Sin embargo, no detectar diferencias en un parámetro no justifica utilizar sólo un sexo en el resto de las investigaciones.

En la EA, muchas funciones de los astrocitos se ven modificadas por la reactividad. La reacción de los astrocitos es, por definición, un acontecimiento secundario; sin embargo, puede influir en la progresión de la enfermedad. Caracterizar mejor la reactividad de estas células en cada modelo de enfermedad neurodegenerativa, es clave para luego entender cuál es la mejor manera de convertir a los astrocitos reactivos en socios beneficiosos de las neuronas vulnerables expuestas a una enfermedad crónica o lesión. Por lo tanto, hemos decidido analizar proteínas expresadas por los astrocitos en tres regiones diferentes del hipocampo: el GD, CA1 y CA3. Observamos que en CA3, los astrocitos se volvieron reactivos en ratas macho inyectadas con STZ, en concordancia con lo publicado anteriormente por nuestro grupo (Zappa Villar et al., 2018), pero no en ratas hembra con y sin ovarios. La falta de diferencia significativa en CA1 y el GD en cuanto al nivel de expresión de GFAP, indica que existen diferencias intra-regionales en la reacción de los astrocitos a la STZ. Efectivamente, la heterogeneidad de los astrocitos en el SNC últimamente está siendo estudiada con diversos tipos de técnicas microscópicas, las cuales revelan una morfología regionalmente estereotipada, que se corresponde con diversos perfiles de expresión génica (Emsley & Macklis, 2006; Endo et al., 2022; Karpf et al., 2022). Nuestros resultados y estos últimos hallazgos realzan la importancia de incluir diversas regiones o subregiones en los estudios, y evitar la generalización de un resultado de una región específica a toda una estructura cerebral.

Hasta ahora, de los pocos trabajos publicados con hembras inyectadas con STZ-icv, solo uno evaluó la reactividad de los astrocitos, mostrando que la expresión de GFAP, pero no de S100B, se encuentra aumentada en el hipocampo de hembras inyectadas con STZ, a las 2, 4 y 8 semanas post inyección (Biasibetti et al., 2017). Sin embargo, es necesario considerar que estas medidas se hicieron mediante ELISA en homogenato de hipocampo, mientras que nuestros resultados fueron obtenidos a partir de la visualización directa de las células astrogiales, y se ven sustentados por los resultados de la vía de JAK2/STAT3, como se precisa a continuación.

Los astrocitos censan múltiples señales de diversa naturaleza, algunas de las cuales pueden activar cascadas de señalización que inducen la reactividad. Entre ellas, la vía de JAK2/STAT3 ha sido descripta como una vía central para la inducción de esta reactividad, incrementando la expresión de genes como *gfap* y *vimentina*, *stat3*, entre otros (Haim, Ceyzériat, et al., 2015). Efectivamente, en diversos contextos patológicos, esta vía se encuentra activa en los astrocitos, como por ejemplo en modelos de neurotoxicidad inducida por diversas drogas y químicos (O'Callaghan et al., 2014), en lesión de médula espinal (Okada et al., 2006), y en modelo de isquemia cerebral (Justicia et al., 2000). En concordancia con los resultados obtenidos para la expresión de GFAP, demostramos que la vía de JAK2/STAT3 se encuentra activa en los astrocitos de las ratas macho. Nuestros resultados apoyan a los de Hindam et al., 2020, hasta ahora el único trabajo de nuestro conocimiento que demuestra que la STZ activa esta vía en el hipocampo de ratas macho, aunque dicho análisis se realizó sobre homogenato proteico. Nuestros resultados demuestran que el modelo de EAe de corto plazo con STZ-icv se incluye en la lista de modelos de enfermedades neurodegenerativas que muestran activada esta vía en los astrocitos, como por ejemplo los ratones transgénicos de EA APP/PS1 y 3xTg-AD, el modelo murino Hdh140 y el modelo murino y primate lenti-Htt82Q de enfermedad de Huntington (Haim, Ceyzériat, et al., 2015). Sin embargo, coincidentemente con los resultados obtenidos para GFAP, la STZ no provocó activación de esta vía en ratas hembra, independiente de los niveles hormonales de estos animales, lo que demuestra que los astrocitos

responden de manera distinta a la STZ según el sexo. En concordancia con nuestros resultados, se ha demostrado una reacción diferencial de los astrocitos según el sexo frente a una injuria o un desafío inflamatorio, en la que los astrocitos de animales machos secretaron más citoquinas proinflamatorias y expresaron factores de reclutamiento de células inmunes en mayor medida comparado con los de animales hembra (Acaz-Fonseca et al., 2015; Santos-Galindo et al., 2011).

Debido a que los astrocitos mantienen una estrecha relación con las sinapsis, nos interesamos en evaluar la densidad sináptica en el hipocampo. Estas células secretan moléculas importantes para la formación y maduración sináptica, expresan transportadores y canales relevantes para controlar la homeostasis de la hendidura sináptica, y comparten con la microglía la función de eliminarlas, aunque por vías distintas (Chung et al., 2015). Además, se estima que un astrocito hipocampal puede envolver más de 100.000 sinapsis (Bushong et al., 2002), lo que les permite monitorear y modificar la función sináptica de forma dinámica, extendiendo y retrayendo rápidamente sus finos procesos de las espinas dendríticas postsinápticas móviles (Haber et al., 2006). La reactividad de los astrocitos no solo implica una notable hipertrofia, sino también alteraciones en su perfil de expresión que tienen el potencial de impactar en las sinapsis y la función neuronal. Nuestros resultados muestran que la STZ provocó una disminución del número de sinapsis hipocampales, en particular en el SL de CA3 de únicamente las ratas macho. Nuestros resultados en ratas macho confirman lo observado previamente por nuestro grupo y otros, en donde demostramos que a 25 días post STZ, la expresión hipocampal de SYT2 y PSD95 (proteínas pre y post sinápticas, respectivamente), se encontraba disminuida (**sección 5.2.4**). De forma similar, en otro trabajo se observó una disminución de diversas proteínas implicadas en la sinapsis en ratas macho pero no en hembras, a los 30 días post inyección de STZ-icv (Bao et al., 2017). Se ha demostrado que la pérdida de sinapsis en la EA correlaciona muy bien con el deterioro cognitivo de los pacientes (Scheff & Price, 2006; Terry et al., 1991), lo que resulta coherente con nuestros resultados en machos y hembras, teniendo en cuenta su comportamiento.

La reducción en el número de sinapsis en enfermedades neurodegenerativas puede ser resultado de diversos factores, incluyendo la neurodegeneración, cambios en la función de los astrocitos y la activación de la microglía en respuesta a lesiones, inflamación o estrés. Efectivamente, la neurodegeneración inducida por la STZ podría explicar la reducción en el número de sinapsis, aunque no hemos estudiado aún si ocurre en la región de CA3, por lo que desconocemos si en esta zona existen diferencias sexuales en la vulnerabilidad neuronal que pueda explicar la diferencia sexual encontrada en lo referido a pérdida de sinapsis.

Como se mencionó, la microglía reactiva podría tener una fuerte influencia en el número de sinapsis, debido a su capacidad de fagocitarlas (Paolicelli et al., 2011; Schafer et al., 2012). Esta función puede encontrarse alterada en distintos contextos patológicos (Rajendran & Paolicelli, 2018). En nuestros resultados previos hemos observamos que la STZ provoca un aumento de la reactividad de estas células, tanto en machos como en hembras, aunque no ha sido comparada entre sexos. Adicionalmente, no es posible asumir que esta población celular está actuando de la misma manera en machos y hembras. Para identificar su acción y comprender su relación con las sinapsis en el contexto de STZ-icv, es necesario determinar el perfil de expresión de las células microgliales para conocer los fenotipos presentes en las distintas regiones del hipocampo.

Por último, decidimos evaluar la expresión de proteínas astrocíticas relevantes para la comunicación neuronal como el transportador de glutamato, GLT1 y el canal de potasio, Kir4.1, cuya expresión podría estar alterada en los astrocitos reactivos, y aún no han sido reportadas en el modelo de STZ-icv.

Los astrocitos están estrechamente asociados a la sinapsis glutamatérgica y son responsables de gran parte de la captación extracelular de glutamato (Andersen et al., 2021), importante para evitar la excitotoxicidad causada por este neurotransmisor, la cual conduce a la pérdida de la función neuronal y a la muerte celular (Dong et al., 2009). Justamente, como se explicó en la **sección 1.1.6**, drogas anti-glutamatérgicas, como la memantina, tienen efectos benéficos aunque limitados, sobre los pacientes con EA (Nyakas et al., 2011). En la EA, la excitotoxicidad parece estar causada por una disminución de la captación de glutamato (Zott et al., 2019), y efectivamente, algunos trabajos muestran expresión disminuida de GLT1 en tejido post mortem de EA (Jacob et al., 2007; Masliah et al., 1996). Sin embargo, en el modelo de STZ-icv no se observó una alteración en la expresión de GLT1 en el hipocampo, independientemente del sexo y del estado ovárico de las hembras, lo que sugiere que la muerte neuronal y pérdida de sinapsis causada por STZ a corto plazo, no está causada por excitotoxicidad. No obstante, niveles normales de expresión no necesariamente implican un normal funcionamiento de la proteína, debido a que diversas modificaciones post traduccionales como la fosforilación, palmitoilación y S-nitrosilación pueden cambiar la actividad del GLT1 (Pajarillo et al., 2019). Efectivamente, en el **Capítulo V** se mostró que la STZ aumenta la expresión de iNOS en el hipocampo, por lo cual esto podría aumentar la S-nitrosilación de GLT1 y afectar su actividad. Por lo tanto, son necesarios más estudios para determinar el efecto de la STZ sobre GLT1.

Dada la estrechez del espacio extracelular, se requieren mecanismos eficaces para mantener el equilibrio del K⁺, el cual experimenta incrementos notables en el medio extracelular después de un potencial de acción. Este ión es crucial para establecer el potencial de membrana en reposo de las células, por lo que cualquier aumento extracelular de K⁺ podría comprometer la actividad neuronal normal (Olsen & Sontheimer, 2008a). Los astrocitos pueden amortiguar estos cambios mediante la captación de K⁺ a través de diversos mecanismos y canales, incluido el canal de potasio Kir4.1, altamente expresado en estas células (Olsen & Sontheimer, 2008b; Tang et al., 2009). Nuestros resultados indican que la administración STZ disminuyó la expresión de Kir4.1 en la región del GD, pero no en CA1 ni en CA3, y este cambio fue independiente del sexo y del estado ovárico de los animales. Se ha informado una disminución de la expresión de Kir 4.1 (mediante RT-qPCR de tejido cerebral) en ratones transgénicos modelo de EA con una severa angiopatía amiloide cerebral, y también en tejido post mortem de pacientes con EA (Wilcock et al., 2009). En el modelo de STZ-icv, se observaron depósitos vasculares de péptido βA a partir de 3 meses post STZ, acentuándose en una angiopatía amiloide más marcada a tiempos más largos luego de la inyección (6 y 9 meses post STZ), en la pared de los vasos sanguíneos meníngeos y corticales (Salkovic-Petrisic et al., 2011). En consecuencia, suponemos que a medida que transcurre más tiempo después de la administración de STZ, esta diferencia podría acentuarse en la región del GD, así como posiblemente en otras áreas del hipocampo.

Retomando los resultados de comportamiento, resulta interesante observar que a pesar de tener una gran disminución de marcadores de neuronas inmaduras generada por la inyección de STZ, las ratas hembra no presentan un marcado déficit comportamental. Por lo tanto, es concebible que otros mecanismos neuronales se activen de manera compensatoria. Además, el hecho de que las ratas hembra no presenten astrocitos reactivos ni disminución de colocalización de los marcadores sinápticos

Bassoon/Homer en el hipocampo, como si lo tienen los machos, podría explicar las diferencias de comportamiento observadas. Por consiguiente, teniendo en cuenta nuestros resultados, y que no hay pruebas directas de diferencias de sexo en el rol de los astrocitos sobre la memoria, son necesarios más estudios que contribuyan a la comprensión del papel de estas células en los procesos cognitivos, considerando de manera comparativa machos y hembras.

Finalmente, no encontramos fuertes evidencias de que la depleción de hormonas ováricas cambie la susceptibilidad de los animales a la STZ. Resta por evaluar el efecto de una ovariectomía de mayor duración o el efecto en ratas de mayor edad. Adicionalmente, reflexionamos que sería interesante cambiar el foco de las hormonas ováricas hacia la testosterona, ya que se podría considerar que las diferencias observadas entre sexos, perfilando a los machos como más vulnerables que las hembras a los efectos de la STZ-icv, podrían anularse en el caso de trabajar con machos castrados. Este es un enfoque interesante de explorar en futuras investigaciones.

6.6 Conclusion

Los resultados de estos trabajos demuestran que la STZ produce cambios celulares y comportamentales dependiendo del sexo, aunque algunas alteraciones resultan conservadas entre machos y hembras. Específicamente, a nivel de conducta hemos observado que la STZ afecta la memoria de reconocimiento y aumenta el comportamiento símil depresivo independientemente del sexo evaluado. A nivel celular, la microglía del hipocampo se vuelve reactiva, y las neuronas tanto maduras como inmaduras resultan fuertemente afectadas tras una inyección de STZ. Sin embargo, en las ratas hembra, la STZ no afectó en igual magnitud el comportamiento típico de especie y la memoria espacial. Además, en las hembras no se encontró afectada la expresión de pTau y péptido β A, las sinapsis ni tampoco la reactividad astrocitaria, como si se observa en ratas macho de la misma edad e inyectados con la misma dosis de la droga. Por lo tanto, concluimos que sería interesante evaluar cambios en el diseño experimental para lograr en las ratas hembra inyectadas con STZ, cambios que reflejen de manera más fidedigna un modelo de EAe. Además, nuestros resultados indican que usar machos y hembras indistintamente no sería una estrategia efectiva, ya que aumentaría la variabilidad de respuesta en los parámetros estudiados por las diferencias en la respuesta a la STZ entre ratas de ambos sexos. Los efectos de la STZ en el cerebro de la hembra deberían continuar siendo estudiados, ya que las causas y mecanismos que subyacen estas diferencias aún son desconocidos para nosotros.

7 Capítulo VII: Conclusiones generales

En los estudios realizados hemos abordado distintos aspectos patológicos claves de la EA, utilizando un modelo de EAe de corto plazo evaluado a 25 días luego de la inyección de STZ-icv, y de mediano plazo, evaluado a 95 días post inyección. En nuestro laboratorio se puso a punto este modelo en ratas macho, y con el hemos evaluado el potencial terapéutico de la transferencia génica de IGF1 y timulina, y hemos realizado un experimento de instilación intranasal con el Sc de MSC de cordón umbilical humano, usando células naïve o que sobreexpresan IGF1. Por último, debido a la falta de información del efecto de la STZ en ratas hembra, hemos realizado dos experimentos destinados a evaluar el comportamiento y la respuesta de células neuronales y gliales de ratas hembra inyectadas con la misma dosis utilizada para generar el modelo de EA en machos. A fin de evaluar un potencial efecto protector de los esteroides ováricos frente a la STZ, en estos experimentos hemos utilizado hembras con ovarios intactos y ovariectomizadas.

Nuestros resultados muestran que el modelo de STZ-icv en ratas macho puede ser utilizado para la evaluación del potencial terapéutico de diversas estrategias, tanto a corto como a mediano plazo, tiempo para el cual se evidencian alteraciones en la memoria, cambios patológicos en diferentes poblaciones cerebrales y un aumento de proteínas marcadoras de la EA (este último para el caso de la utilización del modelo en una etapa aguda). El estudio del modelo de STZ-icv a ambos tiempos, nos permitió elegir agentes terapéuticos con el objetivo de subsanar los cambios neurodegenerativos y el déficit cognitivo asociados a la EA experimental.

Debido a su potente acción neurotrófica, el IGF1 fue elegido para realizar terapia génica a corto plazo en el modelo de STZ-icv en machos. Demostramos que una única inyección en los ventrículos laterales de un vector adenoviral que sobreexpresa IGF1, es capaz de revertir de forma total o parcial, dependiendo el tipo de comportamiento evaluado, el daño cognitivo generado por la STZ. Nuestros resultados demuestran que dicha terapia activó la cascada de PI3K/Akt, la cual estimula la supervivencia y el crecimiento celular. Por otro lado, aunque no se ha evaluado en este trabajo, se sabe que la activación del IGF1R lleva en paralelo, a la activación de la cascada de las MAPK, que estimulan la proliferación celular. Así, proporcionar IGF1 al cerebro normalizó la expresión de proteínas sinápticas y el número de neuronas inmaduras fuertemente disminuido por la STZ, y promovió la proliferación microglial. Si bien la acción benéfica del IGF1 es discutida, ya que ciertos trabajos le otorgan a este factor funciones perjudiciales dependiendo de la patología subyacente y del contexto, nuestros resultados demuestran que el IGF1 es un potente factor restaurativo en la etapa aguda del modelo de STZ-icv, confirmando nuestra primera hipótesis planteada.

Cabe destacar que muchos de los fracasos terapéuticos en fases clínicas se deben a su aplicación en pacientes en estadios avanzados de la EA, donde el daño cerebral es irreversible, por lo que sería importante evaluar un potencial efecto preventivo del IGF1, administrando el vector viral antes de la generación del modelo. Para que intervenciones terapéuticas en humanos destinadas a estadios presintomáticos o prodrómicos de la enfermedad se vuelvan factibles, resulta imprescindible la identificación de biomarcadores preclínicos y un diagnóstico temprano de la EA, actualmente únicas garantías de acelerar el desarrollo exitoso de una nueva terapia para esta patología.

Por otro lado, elegimos a la timulina para realizar terapia génica a mediano plazo, en el momento en el cual los efectos de la STZ no son tan pronunciados como en una etapa aguda. Al contrario del IGF1 con sus conocidas acciones neurotróficas, confirmamos nuestra hipótesis acerca del efecto inmunomodulador en el cerebro que podría tener la timulina. Este es el primer trabajo en el que se usa a la timulina como agente terapéutico en un modelo de enfermedad neurodegenerativa. Demostramos que el incremento sistémico de timulina tiene un fuerte efecto en modular la reactividad de la microglía y los astrocitos. Por un lado, la timulina disminuyó fuertemente la reactividad microglial, a la vez que aumentó la reactividad astrocítica, en ambos casos difiriendo no solo del grupo STZ, sino también del grupo control. Nuestro análisis no nos permite conocer qué funciones de las células gliales se vieron modificadas, pero es posible que estos cambios en la reactividad estén relacionados con los cambios en el comportamiento de los animales, en especial a una notable recuperación de la memoria de reconocimiento. Si bien desconocemos el mecanismo por el cual la timulina ejerció sus acciones en el cerebro, proponemos que por un lado podría deberse a la entrada de este péptido al SNC, y modulación directa sobre la glía, y por otro, mediante la modulación de las células inmunitarias periféricas y su comunicación con el cerebro, sobre todo en un contexto en donde es posible que la BHE esté dañada y la entrada de agentes inmunitarios sea mayor de lo normal. El importante rol de las células gliales en la EA tanto como actores primarios que pueden ser desencadenantes de diversos eventos patológicos, o actores secundarios que los promueven, denota la importancia de investigar el efecto de moléculas que pueden modular la reacción de estas células y sus funciones.

Resulta altamente factible que la compleja patofisiología de la EA necesite de la combinación de tratamientos en lugar de monoterapias, las cuales han sido demostradas ser clínicamente menos eficaces que las terapias combinatorias, siempre y cuando el uso simultáneo de diferentes agentes sea bien tolerado sin mayores problemas de seguridad. Siguiendo este razonamiento, hemos decidido evaluar el efecto de la combinación de la terapia génica con la terapia celular, ambas previamente demostradas por nuestro grupo en ser eficientes en el modelo de STZ-icv. Nuestros resultados sugieren que el Sc de MSC de cordón umbilical humano que sobreexpresan IGF1 podría tener un potencial benéfico en la recuperación del comportamiento afectado de los animales, pero el testeado de esta hipótesis necesita de una repetición de este experimento y posiblemente de un nuevo diseño experimental, que no comprometa la conducta de los animales. Muchos de los trabajos que reportan el uso de la instilación intranasal en roedores como estrategia poco invasiva para acceder al SNC, aplican anestesia para realizar una única instilación, lo cual fue considerado insuficiente para lograr contrarrestar los efectos de la STZ, y promovió un diseño con instilaciones repetidas periódicamente. Sin embargo, proponemos que esto podría ser una causa del comportamiento alterado de los animales, lo cual limita el uso de esta herramienta. Adicionalmente, concluimos que una desventaja importante del modelo de STZ-icv frente a modelos transgénicos, son la preparación de la droga o la inyección icv, pasos experimentales en los que pequeñas variaciones pueden no generar los efectos esperados en los animales. Por lo tanto, resulta imprescindible el uso de baterías de test comportamentales.

Finalmente, es importante no asumir que los enfoques terapéuticos eficaces en machos resultarán igual de exitosos en animales hembra. Está demostrado que las mujeres experimentan una mayor frecuencia y un mayor número de efectos secundarios negativos a los tratamientos farmacológicos que los hombres (Anderson, 2008), como consecuencia del estudio desproporcionado en machos, cuyos resultados fijan, por defecto, un estándar de referencia. Por lo tanto, una completa caracterización del

modelo de STZ-icv en hembras es necesaria, previo a la prueba de diferentes terapias. Durante décadas el error de las investigaciones preclínicas en neurociencias fue asumir que los modelos animales de ambos sexos presentaban el mismo comportamiento. Nuestros resultados demuestran que algunos efectos de la STZ en el cerebro son dependientes del sexo, y, por lo tanto, el diseño experimental que resulta adecuado para establecer el modelo de EAe en machos, parece no serlo para las hembras. En diversos aspectos, tanto comportamentales como moleculares y celulares (especialmente a nivel de la memoria espacial, los astrocitos y las sinapsis), las hembras se mostraron menos afectadas por la STZ-icv, efecto que no pudo ser explicado por la circulación de hormonas ováricas, refutando nuestra cuarta y última hipótesis. Por otro lado, al trabajar con animales hembra es importante considerar que las inferencias sobre el estado cognitivo, que se realizan al observar el comportamiento, está basado en lo conocido y consensuado para los machos. Efectivamente, los test comportamentales más comúnmente utilizados fueron validados hace décadas, momento en el cual se utilizaban casi exclusivamente animales macho. Esto quiere decir que la interpretación de los resultados conductuales no necesariamente es la misma para animales de ambos sexos, y aunque aún falten muchas respuestas a este respecto, resulta un factor importante a tener en consideración en el análisis de las medidas comportamentales.

Finalmente, el estudio de los efectos de la STZ en hembras es un tema que merece profunda atención. El uso de ambos sexos en la investigación básica resulta fundamental para corregir las desigualdades sanitarias basadas en el sexo y el género. Un trabajo riguroso es aquel que contemple machos y hembras (a excepción de aquellos que sólo pueden realizarse en uno de ellos). Para ello resulta fundamental la implementación de políticas que fomenten la consideración del sexo como una variable biológica, como las políticas SABV introducidas en 2016 por el US National Institutes of Health (NIH). Estas recientes iniciativas tienen como objetivo abordar la brecha de conocimiento existente sobre las diferencias debidas al sexo, de manera de mejorar la reproducibilidad y la inclusividad en la investigación financiada con fondos públicos.

En resumen, el modelo de EAe generado mediante inyección de STZ-icv en ratas macho resulta una herramienta útil para evaluar los efectos de diversas terapias neuroprotectoras e inmunomoduladoras en distintos tiempos post-inyección. No obstante, existen aspectos importantes que requieren una mayor profundización para lograr una caracterización más precisa del modelo, lo cual permitirá un diseño terapéutico más específico. El IGF1 demostró ser un potente agente terapéutico con la capacidad de revertir gran parte de los déficits comportamentales del modelo, mientras que la timulina demostró tener un importante potencial para modular ambientes neuroinflamatorios. Finalmente, hemos observado que parte de los efectos tóxicos de la STZ son dependientes del sexo, lo que subraya la necesidad de una investigación más profunda en este aspecto. Reconocemos la importancia de comprender la causa de estas diferencias sexuales, y continuar con estos estudios para generar un modelo de EAe en hembras que sea adecuado para testear el potencial de diversas terapias.

Bibliografía

- Åberg, M. A. I., Åberg, N. D., Hedbäcker, H., Oscarsson, J., & Eriksson, P. S. (2000). Peripheral Infusion of IGF-I Selectively Induces Neurogenesis in the Adult Rat Hippocampus. *The Journal of Neuroscience*, *20*(8), 2896. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-08-02896.2000>
- Abjean, L., Ben Haim, L., Riquelme-Perez, M., Gipchtein, P., Derbois, C., Palomares, M.-A., Petit, F., Hérard, A.-S., Gaillard, M.-C., Guillermier, M., Gaudin-Guérif, M., Aurégan, G., Sagar, N., Héry, C., Dufour, N., Robil, N., Kabani, M., Melki, R., De la Grange, P., ... Escartin, C. (2023). Reactive astrocytes promote proteostasis in Huntington's disease through the JAK2-STAT3 pathway. *Brain*, *146*(1). <https://doi.org/10.1093/brain/awac068>
- Acaz-Fonseca, E., Duran, J. C., Carrero, P., Garcia-Segura, L. M., & Arevalo, M. A. (2015). Sex differences in glia reactivity after cortical brain injury. *GLIA*, *63*(11). <https://doi.org/10.1002/glia.22867>
- Adamsky, A., Kol, A., Kreisel, T., Doron, A., Ozeri-Engelhard, N., Melcer, T., Refaeli, R., Horn, H., Regev, L., Groysman, M., London, M., & Goshen, I. (2018). Astrocytic Activation Generates De Novo Neuronal Potentiation and Memory Enhancement. *Cell*, *174*(1), 59-71.e14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.05.002>
- Afshar, S., Shahidi, S., Rohani, A. H., Komaki, A., & Asl, S. S. (2018). The effect of NAD-299 and TCB-2 on learning and memory, hippocampal BDNF levels and amyloid plaques in Streptozotocin-induced memory deficits in male rats. *Psychopharmacology*, *235*(10), 2809–2822. <https://doi.org/10.1007/s00213-018-4973-x>
- Agrawal, R., Mishra, B., Tyagi, E., Nath, C., & Shukla, R. (2010). Effect of curcumin on brain insulin receptors and memory functions in STZ (ICV) induced dementia model of rat. *Pharmacological Research*, *61*(3), 247–252. <https://doi.org/10.1016/J.PHRS.2009.12.008>
- Agrawal, R., Tyagi, E., Shukla, R., & Nath, C. (2011). Insulin receptor signaling in rat hippocampus: A study in STZ (ICV) induced memory deficit model. *European Neuropsychopharmacology*, *21*(3), 261–273. <https://doi.org/10.1016/J.EURONEURO.2010.11.009>
- Aguado, F., Sánchez-Franco, F., Rodrigo, J., Cacicedo, L., & Martínez-Murillo, R. (1994). Insulin-like growth factor I-immunoreactive peptide in adult human cerebellar purkinje cells: Co-localization with low-affinity nerve growth factor receptor. *Neuroscience*, *59*(3), 641–650. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(94\)90183-X](https://doi.org/10.1016/0306-4522(94)90183-X)
- Aiuti, A., Roncarolo, M. G., & Naldini, L. (2017). Gene therapy for ADA-SCID, the first marketing approval of an ex vivo gene therapy in Europe: paving the road for the next generation of advanced therapy medicinal products. *EMBO Molecular Medicine*, *9*(6), 737. <https://doi.org/10.15252/EMMM.201707573>
- Akirav, I., & Maroun, M. (2006). Ventromedial prefrontal cortex is obligatory for consolidation and reconsolidation of object recognition memory. *Cerebral Cortex*, *16*(12). <https://doi.org/10.1093/cercor/bhj114>
- Akiyama, H., Nishimura, T., Kondo, H., Ikeda, K., Hayashi, Y., & McGeer, P. L. (1994). Expression of the receptor for macrophage colony stimulating factor by brain microglia and its upregulation in brains of patients with Alzheimer's disease and amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Research*, *639*(1). [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(94\)91779-5](https://doi.org/10.1016/0006-8993(94)91779-5)
- Alba, R., Bosch, A., & Chillón, M. (2005). Gutless adenovirus: last-generation adenovirus for gene therapy. *Gene Therapy*, *12 Suppl 1*, S18–S27. <https://doi.org/10.1038/SJ.GT.3302612>
- Allen, J. S., Damasio, H., Grabowski, T. J., Bruss, J., & Zhang, W. (2003). Sexual dimorphism and asymmetries in the gray-white composition of the human cerebrum. *NeuroImage*, *18*(4). [https://doi.org/10.1016/S1053-8119\(03\)00034-X](https://doi.org/10.1016/S1053-8119(03)00034-X)

- Alonso, A. D. C., Zaidi, T., Novak, M., Grundke-Iqbal, I., & Iqbal, K. (2001). Hyperphosphorylation induces self-assembly of τ into tangles of paired helical filaments/straight filaments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *98*(12), 6923. <https://doi.org/10.1073/PNAS.121119298>
- Al-Rahbi, B., Zakaria, R., Othman, Z., Hassan, A., Muthuraju, S., & Wan Mohammad, W. M. Z. (2013). Mood and memory function in ovariectomised rats exposed to social instability stress. *BioMed Research International*, *2013*. <https://doi.org/10.1155/2013/493643>
- Alzheimer Argentina, A., Ignacio Brusco, L., Andrea Pagliarulo, D., Rojo, M., María Romano, D., Natalia Silvero, D., Mabel Suarez, D., Carbonetti, F., Carolina Sylva, D., Díaz, G., Claudia Vanesa Alach SECRETARIA REDACCIÓN Dra Natividad Olivar, A. DE, & León Bravo, C. (2019). *Editorial EDANA Ediciones DIRECTOR-PRESIDENTE*. www.edanaweb.com
- Amiri, S., Haj-Mirzaian, A., Momeny, M., Amini-Khoei, H., Rahimi-Balaei, M., Poursaman, S., Rastegar, M., Nikoui, V., Mokhtari, T., Ghazi-Khansari, M., & Hosseini, M. J. (2017). Streptozotocin induced oxidative stress, innate immune system responses and behavioral abnormalities in male mice. *Neuroscience*, *340*, 373–383. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.11.003>
- Andersen, J. V., Markussen, K. H., Jakobsen, E., Schousboe, A., Waagepetersen, H. S., Rosenberg, P. A., & Aldana, B. I. (2021). Glutamate metabolism and recycling at the excitatory synapse in health and neurodegeneration. In *Neuropharmacology* (Vol. 196). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2021.108719>
- Anderson, G. D. (2008). Chapter 1 Gender Differences in Pharmacological Response. *International Review of Neurobiology*, *83*, 1–10. [https://doi.org/10.1016/S0074-7742\(08\)00001-9](https://doi.org/10.1016/S0074-7742(08)00001-9)
- Anitua, E., Pascual, C., Pérez-Gonzalez, R., Antequera, D., Padilla, S., Orive, G., & Carro, E. (2013). Intranasal delivery of plasma and platelet growth factors using PRGF-Endoret system enhances neurogenesis in a mouse model of Alzheimer's disease. *PloS One*, *8*(9). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0073118>
- Antunes, M., & Biala, G. (2012). The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. *Cognitive Processing*, *13*(2), 93–110. <https://doi.org/10.1007/S10339-011-0430-Z>
- Aquino, J. B., Bolontrade, M. F., García, M. G., Podhajcer, O. L., & Mazzolini, G. (2010). Mesenchymal stem cells as therapeutic tools and gene carriers in liver fibrosis and hepatocellular carcinoma. *Gene Therapy* *2010 17:6*, *17*(6), 692–708. <https://doi.org/10.1038/gt.2010.10>
- Arabi, F., Mansouri, V., & Ahmadbeigi, N. (2022). Gene therapy clinical trials, where do we go? An overview. In *Biomedicine and Pharmacotherapy* (Vol. 153). <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113324>
- Assis, A. C. M., Carvalho, J. L., Jacoby, B. A., Ferreira, R. L. B., Castanheira, P., Diniz, S. O. F., Cardoso, V. N., Goes, A. M., & Ferreira, A. J. (2010). Time-dependent migration of systemically delivered bone marrow mesenchymal stem cells to the infarcted heart. *Cell Transplantation*, *19*(2), 219–230. <https://doi.org/10.3727/096368909X479677>
- Auger, C., Monier, J. C., Savino, W., & Dardenne, M. (1984). Localization of thymulin (FTS-Zn) in mouse thymus. Comparative data using monoclonal antibodies following different plastic embedding procedures. *Biology of the Cell*, *52*(2), 139–146. <https://doi.org/10.1111/J.1768-322X.1985.TB00331.X>
- Ayer-Le Lievre, C., Stahlbom, P. A., & Sara, V. R. (1991). Expression of IGF-I and -II mRNA in the brain and craniofacial region of the rat fetus. *Development (Cambridge, England)*, *111*(1), 105–115. <https://doi.org/10.1242/DEV.111.1.105>
- Azcoitia, I., Barreto, G. E., & Garcia-Segura, L. M. (2019). Molecular mechanisms and cellular events involved in the neuroprotective actions of estradiol. Analysis of sex differences. *Frontiers in Neuroendocrinology*, *55*, 100787. <https://doi.org/10.1016/J.YFRNE.2019.100787>

- Bach, J. F., Dardenne, M., Pleau, J. M., & Rosa, J. (1977). Biochemical characterisation of a serum thymic factor. *Nature*, *266*(5597), 55–57. <https://doi.org/10.1038/266055A0>
- Bach, M. A., Shen-Orr, Z., Lowe, W. L., Roberts, C. T., & Leroith, D. (1991). Insulin-like growth factor I mRNA levels are developmentally regulated in specific regions of the rat brain. *Molecular Brain Research*, *10*(1). [https://doi.org/10.1016/0169-328X\(91\)90054-2](https://doi.org/10.1016/0169-328X(91)90054-2)
- Baio, J., Wiggins, L., Christensen, D. L., Maenner, M. J., Daniels, J., Warren, Z., Kurzius-Spencer, M., Zahorodny, W., Rosenberg, C. R., White, T., Durkin, M. S., Imm, P., Nikolaou, L., Yeargin-Allsopp, M., Lee, L. C., Harrington, R., Lopez, M., Fitzgerald, R. T., Hewitt, A., ... Dowling, N. F. (2018). Prevalence of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years — Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2014. *MMWR Surveillance Summaries*, *67*(6), 1. <https://doi.org/10.15585/MMWR.SS6706A1>
- Baker, J., Liu, J. P., Robertson, E. J., & Efstratiadis, A. (1993). Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth. *Cell*, *8*(75), 73–82.
- Bales, K. R., Verina, T., Cummins, D. J., Du, Y., Dodel, R. C., Saura, J., Fishman, C. E., Delong, C. A., Piccardo, P., Petegnief, V., Ghetti, B., & Paul, S. M. (1999). Apolipoprotein E is essential for amyloid deposition in the APP(V717F) transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *96*(26), 15233–15238. <https://doi.org/10.1073/PNAS.96.26.15233>
- Balin, B. J., Broadwell, R. D., Salzman, M., & El-Kalliny, M. (1986). Avenues for entry of peripherally administered protein to the central nervous system in mouse, rat, and squirrel monkey. *Journal of Comparative Neurology*, *251*(2), 260–280. <https://doi.org/10.1002/CNE.902510209>
- Banks, W. A. (2004). The source of cerebral insulin. *European Journal of Pharmacology*, *490*(1–3). <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2004.02.040>
- Bantubungi, K., Blum, D., Cuvelier, L., Wislet-Gendebien, S., Rogister, B., Brouillet, E., & Schiffmann, S. N. (2008). Stem cell factor and mesenchymal and neural stem cell transplantation in a rat model of Huntington's disease. *Molecular and Cellular Neuroscience*, *37*(3). <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2007.11.001>
- Bao, J., Mahaman, Y. A. R., Liu, R., Wang, J. Z., Zhang, Z., Zhang, B., & Wang, X. (2017). Sex Differences in the cognitive and hippocampal effects of streptozotocin in an animal model of sporadic AD. *Frontiers in Aging Neuroscience*, *9*(OCT). <https://doi.org/10.3389/fnagi.2017.00347>
- Bardehle, S., Krüger, M., Buggenthin, F., Schwausch, J., Ninkovic, J., Clevers, H., Snippert, H. J., Theis, F. J., Meyer-Luehmann, M., Bechmann, I., Dimou, L., & Götz, M. (2013). Live imaging of astrocyte responses to acute injury reveals selective juxtavascular proliferation. *Nature Neuroscience*, *16*(5), 580–586. <https://doi.org/10.1038/nn.3371>
- Barnes, C. A. (1979). Memory Deficits Associated With Senescence: A Neurophysiological and Behavioral Study in the Rat. In *Journal of Comparative and Physiological Psychology* (Vol. 93, Issue 1).
- Barnes, L. L., Wilson, R. S., Bienias, J. L., Schneider, J. A., Evans, D. A., & Bennett, D. A. (2005). Sex Differences in the Clinical Manifestations of Alzheimer Disease Pathology. *Archives of General Psychiatry*, *62*(6), 685–691. <https://doi.org/10.1001/ARCHPSYC.62.6.685>
- Barres, B. A., Hart, I. K., Coles, H. S. R., Burne, J. F., Voyvodic, J. T., Richardson, W. D., & Raff, M. C. (1992). Cell death and control of cell survival in the oligodendrocyte lineage. *Cell*, *70*(1), 31–46. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90531-G](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90531-G)
- Barreto, G., Santos-Galindo, M., Diz-Chaves, Y., Pernía, O., Carrero, P., Azcoitia, I., & Garcia-Segura, L. M. (2009). Selective Estrogen Receptor Modulators Decrease Reactive Astroglia in the Injured Brain: Effects of Aging and Prolonged Depletion of Ovarian Hormones. *Endocrinology*, *150*(11), 5010–5015. <https://doi.org/10.1210/EN.2009-0352>
- Barreto, G., Veiga, S., Azcoitia, I., Garcia-Segura, L. M., & Garcia-Ovejero, D. (2007). Testosterone decreases reactive astroglia and reactive microglia after brain injury in male rats: role of its

- metabolites, oestradiol and dihydrotestosterone. *European Journal of Neuroscience*, 25(10), 3039–3046. <https://doi.org/10.1111/J.1460-9568.2007.05563.X>
- Barzilay, R., Kan, I., Ben-Zur, T., Bulvik, S., Melamed, E., & Offen, D. (2008). Induction of Human Mesenchymal Stem Cells into Dopamine-Producing Cells with Different Differentiation Protocols. *Https://Home.Liebertpub.Com/Scd*, 17(3), 547–554. <https://doi.org/10.1089/SCD.2007.0172>
- Basarkar, A., & Singh, J. (2007). Nanoparticulate systems for polynucleotide delivery. *International Journal of Nanomedicine*, 2(3), 353. [/pmc/articles/PMC2676661/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16812661/)
- Bassani, T. B., Bonato, J. M., Machado, M. M. F., Cópola-Segovia, V., Moura, E. L. R., Zanata, S. M., Oliveira, R. M. M. W., & Vital, M. A. B. F. (2018). Decrease in Adult Neurogenesis and Neuroinflammation Are Involved in Spatial Memory Impairment in the Streptozotocin-Induced Model of Sporadic Alzheimer’s Disease in Rats. *Molecular Neurobiology*, 55(5), 4280–4296. <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0645-9>
- Bayo, J., Fiore, E., Aquino, J. B., Malvicini, M., Rizzo, M., Peixoto, E., Alaniz, L., Piccioni, F., Bolontrade, M., Podhajcer, O., Garcia, M. G., & Mazzolini, G. (2014). Human Umbilical Cord Perivascular Cells Exhibited Enhanced Migration Capacity towards Hepatocellular Carcinoma in Comparison with Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells: A Role for Autocrine Motility Factor Receptor. *BioMed Research International*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/837420>
- Beam, C. R., Kaneshiro, C., Jang, J. Y., Reynolds, C. A., Pedersen, N. L., & Gatz, M. (2018). Differences between Women and Men in Incidence Rates of Dementia and Alzheimer’s Disease. *Journal of Alzheimer’s Disease*, 64(4). <https://doi.org/10.3233/JAD-180141>
- Bellot-Saez, A., Kékesi, O., Morley, J. W., & Buskila, Y. (2017). Astrocytic modulation of neuronal excitability through K⁺ spatial buffering. In *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* (Vol. 77, pp. 87–97). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2017.03.002>
- Ben Haim, L., & Rowitch, D. H. (2016). Functional diversity of astrocytes in neural circuit regulation. In *Nature Reviews Neuroscience* (Vol. 18, Issue 1, pp. 31–41). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrn.2016.159>
- Biasibetti, R., Almeida dos Santos, J. P., Rodrigues, L., Wartchow, K. M., Suardi, L. Z., Nardin, P., Selistre, N. G., Vázquez, D., & 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>
- BIGNAMI, A., & DAHL, D. (1976). THE ASTROGLIAL RESPONSE TO STABBING. IMMUNOFLUORESCENCE STUDIES WITH ANTIBODIES TO ASTROCYTE-SPECIFIC PROTEIN (GFA) IN MAMMALIAN AND SUBMAMMALIAN VERTEBRATES. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 2(2), 99–110. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2990.1976.TB00488.X>
- Biswas, J., Gupta, S., Verma, D. K., Gupta, P., Singh, A., Tiwari, S., Goswami, P., Sharma, S., & Singh, S. (2018). Involvement of glucose related energy crisis and endoplasmic reticulum stress: Insinuation of streptozotocin induced Alzheimer’s like pathology. *Cellular Signalling*, 42, 211–226. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2017.10.018>
- Blaese, R. M., Culver, K. W., Miller, A. D., Carter, C. S., Fleisher, T., Clerici, M., Shearer, G., Chang, L., Chiang, Y., Tolstoshev, P., Greenblatt, J. J., Rosenberg, S. A., Klein, H., Berger, M., Mullen, C. A., Ramsey, W. J., Muul, L., Morgan, R. A., & Anderson, W. F. (1995). T Lymphocyte-Directed Gene Therapy for ADA-SCID: Initial Trial Results After 4 Years. *Science*, 270(5235), 475–480. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.270.5235.475>
- Blanchard, J. W., Akay, L. A., Davila-Velderrain, J., von Maydell, D., Mathys, H., Davidson, S. M., Effenberger, A., Chen, C. Y., Maner-Smith, K., Hajjar, I., Ortlund, E. A., Bula, M., Agbas, E., Ng, A., Jiang, X., Kahn, M., Blanco-Duque, C., Lavoie, N., Liu, L., ... Tsai, L. H. (2022). APOE4 impairs myelination via cholesterol dysregulation in oligodendrocytes. *Nature*, 611(7937). <https://doi.org/10.1038/s41586-022-05439-w>

- 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. In *Frontiers in Endocrinology* (Vol. 5, Issue OCT). <https://doi.org/10.3389/fendo.2014.00161>
- Blennow, K., de Leon, M. J., & Zetterberg, H. (2006). Alzheimer's disease. *The Lancet*, *368*(9533), 387–403. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)69113-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)69113-7)
- Bogdanova, O. V., Kanekar, S., D'Anci, K. E., & Renshaw, P. F. (2013). Factors influencing behavior in the forced swim test. *Physiology & Behavior*, *118*, 227–239. <https://doi.org/10.1016/J.PHYSBEH.2013.05.012>
- Bolborea, M., & Dale, N. (2013). Hypothalamic tanycytes: Potential roles in the control of feeding and energy balance. In *Trends in Neurosciences* (Vol. 36, Issue 2). <https://doi.org/10.1016/j.tins.2012.12.008>
- Bondy, C. A., & Cheng, C. M. (2004). Signaling by insulin-like growth factor 1 in brain. *European Journal of Pharmacology*, *490*(1–3), 25–31. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2004.02.042>
- Bonfanti, L., & Seki, T. (2021). The psa-ncam-positive “immature” neurons: An old discovery providing new vistas on brain structural plasticity. In *Cells* (Vol. 10, Issue 10). <https://doi.org/10.3390/cells10102542>
- Borgstedt, L., Bratke, S., Blobner, M., Pötzl, C., Ulm, B., Jungwirth, B., & Schmid, S. (2022). Isoflurane has no effect on cognitive or behavioral performance in a mouse model of early-stage Alzheimer's disease. *Frontiers in Neuroscience*, *16*, 1716. <https://doi.org/10.3389/FNINS.2022.1033729/BIBTEX>
- Borst, K., Dumas, A. A., & Prinz, M. (2021). Microglia: Immune and non-immune functions. In *Immunity* (Vol. 54, Issue 10). <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2021.09.014>
- Bove, R., Secor, E., Chibnik, L. B., Barnes, L. L., Schneider, J. A., Bennett, D. A., & De Jager, P. L. (2014). Age at surgical menopause influences cognitive decline and Alzheimer pathology in older women. *Neurology*, *82*(3), 222. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000000033>
- Braak, H., & Braak, E. (1991). Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathologica*, *82*(4), 239–259. <https://doi.org/10.1007/BF00308809>
- Brinton, R. D., Thompson, R. F., Foy, M. R., Baudry, M., Wang, J. M., Finch, C. E., Morgan, T. E., Pike, C. J., Mack, W. J., Stanczyk, F. Z., & Nilsen, J. (2008). Progesterone Receptors: Form and Function in Brain. *Frontiers in Neuroendocrinology*, *29*(2), 313. <https://doi.org/10.1016/J.YFRNE.2008.02.001>
- Brinton, R. D., Yao, J., Yin, F., Mack, W. J., & Cadenas, E. (2015). Perimenopause as a neurological transition state. In *Nature Reviews Endocrinology* (Vol. 11, Issue 7, pp. 393–405). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2015.82>
- Broadbent, N. J., Squire, L. R., & Clark, R. E. (2004). Spatial memory, recognition memory, and the hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(40), 14515. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0406344101>
- Broadwell, R. D., & Balin, B. J. (1985). Endocytic and exocytic pathways of the neuronal secretory process and trans synaptic transfer of wheat germ agglutinin-horseradish peroxidase in vivo. *Journal of Comparative Neurology*, *242*(4), 632–650. <https://doi.org/10.1002/CNE.902420410>
- Broxmeyer, H. E., Srour, E., Orschell, C., Ingram, D. A., Cooper, S., Plett, P. A., Mead, L. E., & Yoder, M. C. (2006). Cord blood stem and progenitor cells. *Methods in Enzymology*, *419*, 439–473. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(06\)19018-7](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(06)19018-7)
- Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M. J., Lin, M. Z., Juo, P., Hu, L. S., Anderson, M. J., Arden, K. C., Blenis, J., & Greenberg, M. E. (1999). Akt Promotes Cell Survival by Phosphorylating and Inhibiting a Forkhead Transcription Factor. *Cell*, *96*(6), 857–868. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80595-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80595-4)
- Bu, G. (2009). Apolipoprotein E and its receptors in Alzheimer's disease: pathways, pathogenesis and therapy. *Nature Reviews. Neuroscience*, *10*(5), 333. <https://doi.org/10.1038/NRN2620>

- Bulcha, J. T., Wang, Y., Ma, H., Tai, P. W. L., & Gao, G. (2021). Viral vector platforms within the gene therapy landscape. In *Signal Transduction and Targeted Therapy* (Vol. 6, Issue 1). <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00487-6>
- Bushong, E. A., Martone, M. E., Jones, Y. Z., & Ellisman, M. H. (2002). Protoplasmic Astrocytes in CA1 Stratum Radiatum Occupy Separate Anatomical Domains. *The Journal of Neuroscience*, *22*(1), 183–192. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-01-00183.2002>
- Cahill, L. (2006). Why sex matters for neuroscience. In *Nature Reviews Neuroscience* (Vol. 7, Issue 6, pp. 477–484). <https://doi.org/10.1038/nrn1909>
- Cannon, J. P., O’Driscoll, M., & Litman, G. W. (2012). Specific lipid recognition is a general feature of CD300 and TREM molecules. *Immunogenetics*, *64*(1), 39–47. <https://doi.org/10.1007/S00251-011-0562-4>
- Carro, E., Spuch, C., Trejo, J. L., Antequera, D., & Torres-Aleman, I. (2005). Choroid plexus megalin is involved in neuroprotection by serum insulin-like growth factor I. *Journal of Neuroscience*, *25*(47), 10884–10893. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2909-05.2005>
- Carro, E., Trejo, J. L., Gomez-Isla, T., LeRoith, D., & Torres-Aleman, I. (2002). Serum insulin-like growth factor I regulates brain amyloid- β levels. *Nature Medicine* *2002* *8*:12, *8*(12), 1390–1397. <https://doi.org/10.1038/nm1202-793>
- Carro, E., Trejo, J. L., Spuch, C., Bohl, D., Heard, J. M., & Torres-Aleman, I. (2006). Blockade of the insulin-like growth factor I receptor in the choroid plexus originates Alzheimer’s-like neuropathology in rodents: New cues into the human disease? *Neurobiology of Aging*, *27*(11), 1618–1631. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2005.09.039>
- Carter, S. F., Schöll, M., Almkvist, O., Wall, A., Engler, H., Långström, B., & Nordberg, A. (2012). Evidence for Astrocytosis in Prodromal Alzheimer Disease Provided by ^{11}C -Deuterium-L-Deprenyl: A Multitracer PET Paradigm Combining ^{11}C -Pittsburgh Compound B and ^{18}F -FDG. *Journal of Nuclear Medicine*, *53*(1), 37–46. <https://doi.org/10.2967/JNUMED.110.087031>
- Castellani, R. J., Rolston, R. K., & Smith, M. A. (2010). Alzheimer disease. *Disease-a-Month : DM*, *56*(9), 484–546. <https://doi.org/10.1016/J.DISAMONTH.2010.06.001>
- Chang, C. P., Chio, C. C., Cheong, C. U., Chao, C. M., Cheng, B. C., & Lin, M. T. (2013). Hypoxic preconditioning enhances the therapeutic potential of the secretome from cultured human mesenchymal stem cells in experimental traumatic brain injury. *Clinical Science*, *124*(3), 165–176. <https://doi.org/10.1042/CS20120226>
- Chao, O. Y., de Souza Silva, M. A., Yang, Y. M., & Huston, J. P. (2020). The medial prefrontal cortex - hippocampus circuit that integrates information of object, place and time to construct episodic memory in rodents: Behavioral, anatomical and neurochemical properties. In *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* (Vol. 113). <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2020.04.007>
- Chatterjee, S., Peters, S. A. E., Woodward, M., Arango, S. M., Batty, G. D., Beckett, N., Beiser, A., Borenstein, A. R., Crane, P. K., Haan, M., Hassing, L. B., Hayden, K. M., Kiyohara, Y., Larson, E. B., Li, C. Y., Ninomiya, T., Ohara, T., Peters, R., Russ, T. C., ... Huxley, R. R. (2016). Type 2 diabetes as a risk factor for dementia in women compared with men: A pooled analysis of 2.3 million people comprising more than 100,000 cases of dementia. *Diabetes Care*, *39*(2). <https://doi.org/10.2337/dc15-1588>
- Chen, J. F., Liu, K., Hu, B., Li, R. R., Xin, W., Chen, H., Wang, F., Chen, L., Li, R. X., Ren, S. Y., Xiao, L., Chan, J. R., & Mei, F. (2021). Enhancing myelin renewal reverses cognitive dysfunction in a murine model of Alzheimer’s disease. *Neuron*, *109*(14). <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2021.05.012>
- Chen, L., He, D. M., & Zhang, Y. (2009). The differentiation of human placenta-derived mesenchymal stem cells into dopaminergic cells in vitro. *Cellular & Molecular Biology Letters*, *14*(3), 528–536. <https://doi.org/10.2478/S11658-009-0015-3>

- Chen, Y., Guo, Z., Mao, Y. F., Zheng, T., & Zhang, B. (2018). Intranasal Insulin Ameliorates Cerebral Hypometabolism, Neuronal Loss, and Astroglialosis in Streptozotocin-Induced Alzheimer's Rat Model. *Neurotoxicity Research*, *33*(4). <https://doi.org/10.1007/s12640-017-9809-7>
- Chen, Y., & Heiman, M. L. (2001). Increased weight gain after ovariectomy is not a consequence of leptin resistance. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, *280*(2 43-2). <https://doi.org/10.1152/AJPENDO.2001.280.2.E315/ASSET/IMAGES/LARGE/H10210271007.JPEG>
- Chen, Y., Liang, Z., Blanchard, J., Dai, C. L., Sun, S., Lee, M. H., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Liu, F., & 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). <https://doi.org/10.1007/s12035-012-8375-5>
- Chesler, E. J., Wilson, S. G., Lariviere, W. R., Rodriguez-Zas, S. L., & Mogil, J. S. (2002). Influences of laboratory environment on behavior. *Nature Neuroscience*.
- Chávez-Gutiérrez, L., Bammens, L., Benilova, I., Vandersteen, A., Benurwar, M., Borgers, M., Lismont, S., Zhou, L., Van Cleynenbreugel, S., Esselmann, H., Wiltfang, J., Serneels, L., Karran, E., Gijzen, H., Schymkowitz, J., Rousseau, F., Broersen, K., & De Strooper, B. (2012). The mechanism of γ -Secretase dysfunction in familial Alzheimer disease. *The EMBO Journal*, *31*(10), 2261. <https://doi.org/10.1038/EMBOJ.2012.79>
- Chhatwal, J. P., Schultz, A. P., Johnson, K. A., Hedden, T., Jaimes, S., Benzinger, T. L. S., Jack, C., Ances, B. M., Ringman, J. M., Marcus, D. S., Ghetti, B., Farlow, M. R., Danek, A., Levin, J., Yakushev, I., Laske, C., Koeppe, R. A., Galasko, D. R., Xiong, C., ... Sperling, R. A. (2018). Preferential degradation of cognitive networks differentiates Alzheimer's disease from ageing. *Brain*, *141*(5), 1486–1500. <https://doi.org/10.1093/brain/awy053>
- Chow, H., & Herrup, K. (2015). Genomic integrity and the ageing brain. *Nature Reviews Neuroscience*, *16*(11), 672–684. <https://doi.org/10.1038/nrn4020>
- Chung, W. S., Allen, N. J., & Eroglu, C. (2015). Astrocytes control synapse formation, function, and elimination. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *7*(9). <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A020370>
- Cleary, J. P., Walsh, D. M., Hofmeister, J. J., Shankar, G. M., Kuskowski, M. A., Selkoe, D. J., & Ashe, K. H. (2005). Natural oligomers of the amyloid-beta protein specifically disrupt cognitive function. *Nature Neuroscience*, *8*(1), 79–84. <https://doi.org/10.1038/NN1372>
- Cohen, S. J., Munchow, A. H., Rios, L. M., Zhang, G., Ásgeirsdóttir, H. N., & Stackman, R. W. (2013). The Rodent Hippocampus Is Essential for Nonspatial Object Memory. *Current Biology*, *23*(17), 1685–1690. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.07.002>
- Colettis, N. C., Habif, M., Oberholzer, M. V., Filippin, F., & Jerusalinsky, D. A. (2022). Differences in learning and memory between middle-aged female and male rats. *Learning and Memory*, *29*(5), 120–125. <https://doi.org/10.1101/LM.053578.122/-/DC1>
- Colonna, M., & Butovsky, O. (2017). Microglia Function in the Central Nervous System During Health and Neurodegeneration. *Annual Review of Immunology*, *35*, 441. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-IMMUNOL-051116-052358>
- Congdon, E. E., & Sigurdsson, E. M. (2018). Tau-targeting therapies for Alzheimer disease. *Nature Reviews. Neurology*, *14*(7), 399–415. <https://doi.org/10.1038/S41582-018-0013-Z>
- Consolini, R., Legitimo, A., Calleri, A., & Milani, M. (2000). Distribution of age-related thymulin titres in normal subjects through the course of life. *Clinical and Experimental Immunology*, *121*(3), 444. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2249.2000.01315.X>
- Corder, E. H., Saunders, A. M., Strittmatter, W. J., Schmechel, D. E., Gaskell, P. C., Small, G. W., Roses, A. D., Haines, J. L., & Pericak-Vance, M. A. (1993). Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science (New York, N.Y.)*, *261*(5123), 921–923. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.8346443>

- Cosgrove, K. P., Mazure, C. M., & Staley, J. K. (2007). Evolving Knowledge of Sex Differences in Brain Structure, Function and Chemistry. *Biological Psychiatry*, *62*(8), 847. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPSYCH.2007.03.001>
- Craft, S., Asthana, S., Cook, D. G., Baker, L. D., Cherrier, M., Purganan, K., Wait, C., Petrova, A., Latendresse, S., Watson, G. S., Newcomer, J. W., Schellenberg, G. D., & Krohn, A. J. (2003). Insulin dose–response effects on memory and plasma amyloid precursor protein in Alzheimer’s disease: interactions with apolipoprotein E genotype. *Psychoneuroendocrinology*, *28*(6), 809–822. [https://doi.org/10.1016/S0306-4530\(02\)00087-2](https://doi.org/10.1016/S0306-4530(02)00087-2)
- Craft, S., Baker, L. D., Montine, T. J., Minoshima, S., Watson, G. S., Claxton, A., Arbuckle, M., Callaghan, M., Tsai, E., Plymate, S. R., Green, P. S., Leverenz, J., Cross, D., & Gerton, B. (2012). Intranasal insulin therapy for Alzheimer disease and amnesic mild cognitive impairment: A pilot clinical trial. *Archives of Neurology*, *69*(1). <https://doi.org/10.1001/archneurol.2011.233>
- Crusio, W. E. (2001). Genetic dissection of mouse exploratory behaviour. *Behavioural Brain Research*, *125*(1–2), 127–132. [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(01\)00280-7](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(01)00280-7)
- Cui, Q. L., Zheng, W. H., Quirion, R., & Almazan, G. (2005). Inhibition of Src-like kinases reveals Akt-dependent and -independent pathways in insulin-like growth factor I-mediated oligodendrocyte progenitor survival. *The Journal of Biological Chemistry*, *280*(10), 8918–8928. <https://doi.org/10.1074/JBC.M414267200>
- Cunningham, C. J., Redondo-Castro, E., & Allan, S. M. (2018). The therapeutic potential of the mesenchymal stem cell secretome in ischaemic stroke. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, *38*(8), 1276. <https://doi.org/10.1177/0271678X18776802>
- Da Fonseca, L. M. B., Battistella, V., De Freitas, G. R., Gutfilen, B., Dos Santos Goldenberg, R. C., Maiolino, A., Wajnberg, E., Rosado De Castro, P. H., Mendez-Otero, R., & Andre, C. (2009). Early tissue distribution of bone marrow mononuclear cells after intra-arterial delivery in a patient with chronic stroke. *Circulation*, *120*(6), 539–541. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.109.863084>
- da Silva, A. L., de Oliveira, G. P., Kim, N., Cruz, F. F., Kitoko, J. Z., Blanco, N. G., Martini, S. V., Hanes, J., Rocco, P. R. M., Suk, J. S., & Morales, M. M. (2020). Nanoparticle-based thymulin gene therapy therapeutically reverses key pathology of experimental allergic asthma. *Science Advances*, *6*(24), 7973–7983. <https://doi.org/10.1126/SCIADV.AAY7973>
- Da Silva, A. L., Martini, S. V., Abreu, S. C., Samary, C. D. S., Diaz, B. L., Fernezlian, S., De Sá, V. K., Capelozzi, V. L., Boylan, N. J., Goya, R. G., Suk, J. S., Rocco, P. R. M., Hanes, J., & Morales, M. M. (2014). DNA Nanoparticle-Mediated Thymulin Gene Therapy Prevents Airway Remodeling in Experimental Allergic Asthma. *Journal of Controlled Release : Official Journal of the Controlled Release Society*, *180*(1), 125. <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2014.02.010>
- da Silva Meirelles, L., Chagastelles, P. C., & Nardi, N. B. (2006). Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *Journal of Cell Science*, *119*(Pt 11), 2204–2213. <https://doi.org/10.1242/JCS.02932>
- Da Silva Moreira, S. F., Nunes, E. A., Kuo, J., De MacEdo, I. C., Muchale, A., De Oliveira, C., Scarabelot, V. L., Marques Filho, P. R., Medeiros, L. F., Caumo, W., & Torres, I. L. S. (2016). Hypoestrogenism alters mood: Ketamine reverses depressive-like behavior induced by ovariectomy in rats. *Pharmacological Reports : PR*, *68*(1), 109–115. <https://doi.org/10.1016/J.PHAREP.2015.06.009>
- Dalli, T., Beker, M., Terzioglu-Usak, S., Akbas, F., & Elibol, B. (2018). Thymoquinone activates MAPK pathway in hippocampus of streptozotocin-treated rat model. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, *99*, 391–401. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.01.047>
- Dardenne, M., & Bach, J.-F. (1973). Studies on thymus products: I. Modification of rosette-forming cells by thymic extracts. Determination of the target RFC sub-population. *Immunology*, *25*(3), 343. [/pmc/articles/PMC1423062/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC1423062/?report=abstract)

- Davalos, D., Grutzendler, J., Yang, G., Kim, J. V., Zuo, Y., Jung, S., Littman, D. R., Dustin, M. L., & Gan, W. B. (2005). ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nature Neuroscience* 2005 8:6, 8(6), 752–758. <https://doi.org/10.1038/nn1472>
- Daws, M. R., Sullam, P. M., Niemi, E. C., Chen, T. T., Tchao, N. K., & Seaman, W. E. (2003). Pattern Recognition by TREM-2: Binding of Anionic Ligands. *The Journal of Immunology*, 171(2), 594–599. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.171.2.594>
- de Brouwer, G., Fick, A., Harvey, B. H., & Wolmarans, D. W. (2019). A critical inquiry into marble-burying as a preclinical screening paradigm of relevance for anxiety and obsessive–compulsive disorder: Mapping the way forward. In *Cognitive, Affective and Behavioral Neuroscience* (Vol. 19, Issue 1). Springer New York LLC. <https://doi.org/10.3758/s13415-018-00653-4>
- de Bruin, J. P. C., Sánchez-Santed, F., Heinsbroek, R. P. W., Donker, A., & Postmes, P. (1994). A behavioural analysis of rats with damage to the medial prefrontal cortex using the Morris water maze: evidence for behavioural flexibility, but not for impaired spatial navigation. *Brain Research*, 652(2), 323–333. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(94\)90243-7](https://doi.org/10.1016/0006-8993(94)90243-7)
- De Felice, F. G., Vieira, M. N. N., Bomfim, T. R., Decker, H., Velasco, P. T., Lambert, M. P., Viola, K. L., Zhao, W.-Q., Ferreira, S. T., & Klein, W. L. (2009). Protection of synapses against Alzheimer's-linked toxins: Insulin signaling prevents the pathogenic binding of A oligomers. www.pnas.org/cgi/content/full/
- de Flores, R., Das, S. R., Xie, L., Wisse, L. E. M., Lyu, X., Shah, P., Yushkevich, P. A., & Wolk, D. A. (2022). Medial Temporal Lobe Networks in Alzheimer's Disease: Structural and Molecular Vulnerabilities. *Journal of Neuroscience*, 42(10), 2131–2141. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0949-21.2021>
- De los Angeles García, M., Millán, C., Balmaceda-Aguilera, C., Castro, T., Pastor, P., Montecinos, H., Reinicke, K., Zúñiga, F., Vera, J. C., Oñate, S. A., & Nualart, F. (2003). Hypothalamic ependymal-glia cells express the glucose transporter GLUT2, a protein involved in glucose sensing. *Journal of Neurochemistry*, 86(3). <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.01892.x>
- Deacon, R. M. J., & Rawlins, J. N. P. (2005). Hippocampal lesions, species-typical behaviours and anxiety in mice. *Behavioural Brain Research*, 156(2), 241–249. <https://doi.org/10.1016/J.BBR.2004.05.027>
- Dehghan-Shasaltaneh, M., Naghdi, N., Choopani, S., Alizadeh, L., Bolouri, B., Masoudi-Nejad, A., & Riazi, G. H. (2016). Determination of the Best Concentration of Streptozotocin to Create a Diabetic Brain Using Histological Techniques. *Journal of Molecular Neuroscience*, 59(1), 24–35. <https://doi.org/10.1007/s12031-015-0702-7>
- Deng, W., Aimone, J. B., & Gage, F. H. (2010). New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nature Reviews. Neuroscience*, 11(5), 339. <https://doi.org/10.1038/NRN2822>
- Depp, C. M., Nave, K., & Lab, K. N. (2022). Ageing-associated myelin dysfunction drives amyloid deposition in mouse models of Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia*, 18(S4). <https://doi.org/10.1002/alz.061183>
- Desai, T. R., Leeper, N. J., Hynes, K. L., & Gewertz, B. L. (2002). Interleukin-6 causes endothelial barrier dysfunction via the protein kinase C pathway. *Journal of Surgical Research*, 104(2), 118–123. <https://doi.org/10.1006/jsre.2002.6415>
- Deshmukh, R., Kaundal, M., Bansal, V., & Samardeep. (2016). Caffeic acid attenuates oxidative stress, learning and memory deficit in intra-cerebroventricular streptozotocin induced experimental dementia in rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedicine & Pharmacotherapie*, 81, 56–62. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2016.03.017>
- Detke, M. J., Rickels, M., & Lucki, I. (1995). Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. *Psychopharmacology*, 121(1), 66–72. <https://doi.org/10.1007/BF02245592>
- Dickerson, B. C., Bakkour, A., Salat, D. H., Feczko, E., Pacheco, J., Greve, D. N., Grodstein, F., Wright, C. I., Blacker, D., Rosas, H. D., Sperling, R. A., Atri, A., Growdon, J. H., Hyman, B. T., Morris, J. C., Fischl, B.,

- & Buckner, R. L. (2009). The Cortical Signature of Alzheimer's Disease: Regionally Specific Cortical Thinning Relates to Symptom Severity in Very Mild to Mild AD Dementia and is Detectable in Asymptomatic Amyloid-Positive Individuals. *Cerebral Cortex (New York, NY)*, *19*(3), 497. <https://doi.org/10.1093/CERCOR/BHN113>
- Dickerson, B. C., Stoub, T. R., Shah, R. C., Sperling, R. A., Killiany, R. J., Albert, M. S., Hyman, B. T., Blacker, D., & Detolledo-Morrell, L. (2011). Alzheimer-signature MRI biomarker predicts AD dementia in cognitively normal adults. *Neurology*, *76*(16), 1395. <https://doi.org/10.1212/WNL.0B013E3182166E96>
- Dimou, L., & Götz, M. (2014). Glial cells as progenitors and stem cells: New roles in the healthy and diseased brain. *Physiological Reviews*, *94*(3), 709–737. <https://doi.org/10.1152/PHYSREV.00036.2013/ASSET/IMAGES/LARGE/Z9J0021426900004.JPEG>
- Dityatev, A., Dityateva, G., Sytnyk, V., Delling, M., Toni, N., Nikonenko, I., Muller, D., & Schachner, M. (2004). Polysialylated neural cell adhesion molecule promotes remodeling and formation of hippocampal synapses. *Journal of Neuroscience*, *24*(42). <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1702-04.2004>
- Diz-Chaves, Y., Pernía, O., Carrero, P., & Garcia-Segura, L. M. (2012). Prenatal stress causes alterations in the morphology of microglia and the inflammatory response of the hippocampus of adult female mice. *Journal of Neuroinflammation*, *9*, 71. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-9-71>
- Djiogue, S., Djiyou Djeuda, A. B., Seke Etet, P. F., Ketcha Wanda, G. J. M., Djikem Tadah, R. N., & Njamen, D. (2018). Memory and exploratory behavior impairment in ovariectomized Wistar rats. *Behavioral and Brain Functions*, *14*(1). <https://doi.org/10.1186/s12993-018-0146-7>
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. C., Krause, D. S., Deans, R. J., Keating, A., Prockop, D. J., & Horwitz, E. M. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, *8*(4), 315–317. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>
- Dong, X. X., Wang, Y., & Qin, Z. H. (2009). Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. In *Acta Pharmacologica Sinica* (Vol. 30, Issue 4). <https://doi.org/10.1038/aps.2009.24>
- Doorn, K. J., Goudriaan, A., Blits-Huizinga, C., Bol, J. G. J. M., Rozemuller, A. J., Hoogland, P. V. J. M., Lucassen, P. J., Drukarch, B., Van De Berg, W. D. J., & Van Dam, A. M. (2014). Increased Amoeboid Microglial Density in the Olfactory Bulb of Parkinson's and Alzheimer's Patients. *Brain Pathology*, *24*(2), 152. <https://doi.org/10.1111/BPA.12088>
- Doré, S., Kar, S., & Quirion, R. (1997). Insulin-like growth factor I protects and rescues hippocampal neurons against β -amyloid- and human amylin-induced toxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *94*(9). <https://doi.org/10.1073/pnas.94.9.4772>
- Dos Santos, J. P. A., Vizuete, A., Hansen, F., Biasibetti, R., & Gonçalves, C. A. (2018). Early and Persistent O-GlcNAc Protein Modification in the Streptozotocin Model of Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, *61*(1), 237–249. <https://doi.org/10.3233/JAD-170211>
- Drachman, D. A. (1977). Memory and cognitive function in man: does the cholinergic system have a specific role? *Neurology*, *27*(8), 783–790. <https://doi.org/10.1212/WNL.27.8.783>
- Drachman, D. A., & Leavitt, J. (1974). Human Memory and the Cholinergic System: A Relationship to Aging? *Archives of Neurology*, *30*(2), 113–121. <https://doi.org/10.1001/ARCHNEUR.1974.00490320001001>
- Du, L. L., Xie, J. Z., Cheng, X. S., Li, X. H., Kong, F. L., Jiang, X., Ma, Z. W., Wang, J. Z., Chen, C., & Zhou, X. W. (2014). Activation of sirtuin 1 attenuates cerebral ventricular streptozotocin-induced tau hyperphosphorylation and cognitive injuries in rat hippocampi. *Age*, *36*(2). <https://doi.org/10.1007/s11357-013-9592-1>
- Dube, I. D., & Cournoyer, D. (1995). Gene therapy: Here to stay. In *CMAJ. Canadian Medical Association Journal* (Vol. 152, Issue 10).

- Duelli, R., Schröck, H., Kuschinsky, W., & Hoyer, S. (1994). Intracerebroventricular injection of streptozotocin induces discrete local changes in cerebral glucose utilization in rats. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 12(8), 737–743. [https://doi.org/10.1016/0736-5748\(94\)90053-1](https://doi.org/10.1016/0736-5748(94)90053-1)
- Duyckaerts, C., Potier, M. C., & Delatour, B. (2008). Alzheimer disease models and human neuropathology: similarities and differences. *Acta Neuropathologica*, 115(1), 5–38. <https://doi.org/10.1007/S00401-007-0312-8>
- Ebert, A. D., Beres, A. J., Barber, A. E., & Svendsen, C. N. (2008). Human neural progenitor cells overexpressing IGF-1 protect dopamine neurons and restore function in a rat model of Parkinson's disease. *Experimental Neurology*, 209(1), 213–223. <https://doi.org/10.1016/J.EXPNEUROL.2007.09.022>
- Ekstrom, A. D., Kahana, M. J., Caplan, J. B., Fields, T. A., Isham, E. A., Newman, E. L., & Fried, I. (2003). Cellular networks underlying human spatial navigation. *Nature*, 425(6954), 184–188. <https://doi.org/10.1038/nature01964>
- El Halawany, A. M., El Sayed, N. S., Abdallah, H. M., & El Dine, R. S. (2017). Protective effects of gingerol on streptozotocin-induced sporadic Alzheimer's disease: emphasis on inhibition of β -amyloid, COX-2, alpha-, beta - secretases and APH1a. *Scientific Reports* 2017 7:1, 7(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02961-0>
- Eleuteri, S., & Fierabracci, A. (2019). Insights into the Secretome of Mesenchymal Stem Cells and Its Potential Applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(18). <https://doi.org/10.3390/IJMS20184597>
- Elgh, E., Lindqvist Åstot, A., Fagerlund, M., Eriksson, S., Olsson, T., & Näsman, B. (2006). Cognitive dysfunction, hippocampal atrophy and glucocorticoid feedback in Alzheimer's disease. *Biological Psychiatry*, 59(2), 155–161. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2005.06.017>
- Elsner, M., Guldbakke, B., Tiedge, M., Munday, R., & Lenzen, S. (2000). Relative importance of transport and alkylation for pancreatic beta-cell toxicity of streptozotocin. *Diabetologia*, 43(12), 1528–1533. <https://doi.org/10.1007/S001250051564/METRICS>
- Emsley, J. G., & Macklis, J. D. (2006). *Astroglial heterogeneity closely reflects the neuronal-defined anatomy of the adult murine CNS*.
- Endo, F., Kasai, A., Soto, J. S., Yu, X., Qu, Z., Hashimoto, H., Gradinaru, V., Kawaguchi, R., & Khakh, B. S. (2022). Molecular basis of astrocyte diversity and morphology across the CNS in health and disease. *Science*, 378(6619). <https://doi.org/10.1126/science.adc9020>
- Escartin, C., Galea, E., Lakatos, A., O'Callaghan, J. P., Petzold, G. C., Serrano-Pozo, A., Steinhäuser, C., Volterra, A., Carmignoto, G., Agarwal, A., Allen, N. J., Araque, A., Barbeito, L., Barzilai, A., Bergles, D. E., Bonvento, G., Butt, A. M., Chen, W. T., Cohen-Salmon, M., ... Verkhratsky, A. (2021). Reactive astrocyte nomenclature, definitions, and future directions. In *Nature Neuroscience* (Vol. 24, Issue 3, pp. 312–325). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41593-020-00783-4>
- Escartin, C., Guillemaud, O., & Carrillo-de Sauvage, M. A. (2019). Questions and (some) answers on reactive astrocytes. In *GLIA* (Vol. 67, Issue 12, pp. 2221–2247). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/glia.23687>
- Evans, D. B., Rank, K. B., Bhattacharya, K., Thomsen, D. R., Gurney, M. E., & Sharma, S. K. (2000). Tau phosphorylation at serine 396 and serine 404 by human recombinant tau protein kinase II inhibits tau's ability to promote microtubule assembly. *Journal of Biological Chemistry*, 275(32), 24977–24983. <https://doi.org/10.1074/jbc.M000808200>
- Falomir-Lockhart, E., Dolcetti, F. J. C., García-Segura, L. M., Hereñú, C. B., & Bellini, M. J. (2019). IGF1 Gene Therapy Modifies Microglia in the Striatum of Senile Rats. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 11. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2019.00048>

- Falomir-Lockhart, E., Dolcetti, F. J. C., Herrera, M. L., Pennini, J., Zappa Villar, M. F., Salinas, G., Portiansky, E., Spittau, B., Lacunza, E., Hereñú, C. B., & Bellini, M. J. (2022). IGF-1 Gene Transfer Modifies Inflammatory Environment and Gene Expression in the Caudate-Putamen of Aged Female Rat Brain. *Molecular Neurobiology*, *59*(6). <https://doi.org/10.1007/s12035-022-02791-w>
- Fattore, A. Del, Luciano, R., Pascucci, L., Goffredo, B. M., Giorda, E., Scapatucci, M., Fierabracci, A., & Muraca, M. (2015). Immunoregulatory Effects of Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles on T Lymphocytes. *Cell Transplantation*, *24*(12), 2615–2627. <https://doi.org/10.3727/096368915X687543>
- Faubel, R., Westendorf, C., Bodenschatz, E., & Eichele, G. (2016). Cilia-based flow network in the brain ventricles. *Science*, *353*(6295), 176–178. <https://doi.org/10.1126/science.aae0450>
- Fernandez, A. M., Gonzalez De La Vega, A., & Torres-Aleman, I. (1998). Insulin-like growth factor I restores motor coordination in a rat model of cerebellar ataxia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *95*(3). <https://doi.org/10.1073/pnas.95.3.1253>
- Fernandez, A. M., & Torres-Alemán, I. (2012). The many faces of insulin-like peptide signalling in the brain. In *Nature Reviews Neuroscience* (Vol. 13, Issue 4, pp. 225–239). <https://doi.org/10.1038/nrn3209>
- Fine, A., Hoyle, C., Maclean, C. J., LeVatte, T. L., Baker, H. F., & Ridley, R. M. (1997). Learning impairments following injection of a selective cholinergic immunotoxin, ME20.4 IgG-saporin, into the basal nucleus of Meynert in monkeys. *Neuroscience*, *81*(2), 331–343. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(97\)00208-X](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(97)00208-X)
- Fiore, E. J., Bayo, J. M., Garcia, M. G., Malvicini, M., Lloyd, R., Piccioni, F., Rizzo, M., Peixoto, E., Sola, M. B., Atorrasagasti, C., Alaniz, L., Camilletti, M. A., Enguita, M., Prieto, J., Aquino, J. B., & Mazzolini, G. (2015). Mesenchymal stromal cells engineered to produce IGF-I by recombinant adenovirus ameliorate liver fibrosis in mice. *Stem Cells and Development*, *24*(6), 791–801. <https://doi.org/10.1089/scd.2014.0174>
- Fischer, D., Mukrasch, M. D., Biernat, J., Bibow, S., Blackledge, M., Griesinger, C., Mandelkow, E., & Zweckstetter, M. (2009). Conformational changes specific for pseudophosphorylation at serine 262 selectively impair binding of tau to microtubules. *Biochemistry*, *48*(42), 10047–10055. https://doi.org/10.1021/BI901090M/SUPPL_FILE/BI901090M_SI_001.PDF
- Fitz, N. F., Gibbs, R. B., & Johnson, D. A. (2006). Aversive stimulus attenuates impairment of acquisition in a delayed match to position T-maze task caused by a selective lesion of septo-hippocampal cholinergic projections. *Brain Research Bulletin*, *69*(6). <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2006.03.011>
- Fleisher, A., Grundman, M., Jack Jr, C. R., Petersen, R. C., Taylor, C., Kim, H. T., Schiller, D. H. B., Bagwell, V., Sencakova, D., Weiner, M. F., DeCarli, C., DeKosky, S. T., van Dyck, C. H., Thal, L. J. T., & Alzheimer's Disease Cooperative Study. (2005). Sex, Apolipoprotein E ϵ 4 Status, and Hippocampal Volume in Mild Cognitive Impairment. *Archives of Neurology*, *62*(6), 953. <https://doi.org/10.1001/archneur.62.6.953>
- Forwood, S. E., Winters, B. D., & Bussey, T. J. (2005). Hippocampal lesions that abolish spatial maze performance spare object recognition memory at delays of up to 48 hours. *Hippocampus*, *15*(3), 347–355. <https://doi.org/10.1002/HIPO.20059>
- Fox, M. A., & Sanes, J. R. (2007). Synaptotagmin I and II are present in distinct subsets of central synapses. *Journal of Comparative Neurology*, *503*(2). <https://doi.org/10.1002/cne.21381>
- Fox, N. C., Warrington, E. K., Freeborough, P. A., Hartikainen, P., Kennedy, A. M., Stevens, J. M., & Rossor, M. N. (1996). Presymptomatic hippocampal atrophy in Alzheimer's disease. A longitudinal MRI study. *Brain: A Journal of Neurology*, *119* (Pt 6)(6), 2001–2007. <https://doi.org/10.1093/BRAIN/119.6.2001>
- Frautschy, S. A., Yang, F., Irrizarry, M., Hyman, B., Saido, T. C., Hsiao, K., & Cole, G. M. (1998). Microglial response to amyloid plaques in APPsw transgenic mice. *American Journal of Pathology*, *152*(1).

- Freiherr, J., Hallschmid, M., Frey, W. H., Brünner, Y. F., Chapman, C. D., Hölscher, C., Craft, S., De Felice, F. G., & Benedict, C. (2013). Intranasal insulin as a treatment for alzheimer's disease: A review of basic research and clinical evidence. In *CNS Drugs* (Vol. 27, Issue 7). <https://doi.org/10.1007/s40263-013-0076-8>
- Friedrich, R. P., Tepper, K., Rönicke, R., Soom, M., Westermann, M., Reymann, K., Kaether, C., & Fändrich, M. (2010). Mechanism of amyloid plaque formation suggests an intracellular basis of Abeta pathogenicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(5), 1942–1947. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0904532106>
- Frost, B., Jacks, R. L., & Diamond, M. I. (2009). Propagation of Tau misfolding from the outside to the inside of a cell. *Journal of Biological Chemistry*, *284*(19), 12845–12852. <https://doi.org/10.1074/jbc.M808759200>
- Gao, S., Hendrie, H. C., Hall, K. S., & Hui, S. (1998). The relationships between age, sex, and the incidence of dementia and Alzheimer disease: a meta-analysis. *Archives of General Psychiatry*, *55*(9), 809–815. <https://doi.org/10.1001/ARCHPSYC.55.9.809>
- Gao, X., Kim, K. S., & Liu, D. (2007). Nonviral gene delivery: What we know and what is next. *The AAPS Journal*, *9*(1), E92. <https://doi.org/10.1208/AAPSJ0901009>
- García-Cáceres, C., Quarta, C., Varela, L., Gao, Y., Gruber, T., Legutko, B., Jastroch, M., Johansson, P., Ninkovic, J., Yi, C. X., Le Thuc, O., Szigeti-Buck, K., Cai, W., Meyer, C. W., Pfluger, P. T., Fernandez, A. M., Luquet, S., Woods, S. C., Torres-Alemán, I., ... Tschöp, M. H. (2016). Astrocytic Insulin Signaling Couples Brain Glucose Uptake with Nutrient Availability. *Cell*, *166*(4). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.07.028>
- Gastinel, L. N., Dardenne, M., Pleau, J. M., & Bach, J. F. (1984). Studies on the zinc binding site to the serum thymic factor. *Biochimica et Biophysica Acta*, *797*(2), 147–155. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(84\)90116-8](https://doi.org/10.1016/0304-4165(84)90116-8)
- Gater, R., Tansella, M., Korten, A., Tiemens, B. G., Mavreas, V. G., & Olatawura, M. O. (1998). Sex differences in the prevalence and detection of depressive and anxiety disorders in general health care settings: report from the World Health Organization Collaborative Study on Psychological Problems in General Health Care. *Archives of General Psychiatry*, *55*(5), 405–413. <https://doi.org/10.1001/ARCHPSYC.55.5.405>
- Gatti, S., Bruno, S., Deregibus, M. C., Sordi, A., Cantaluppi, V., Tetta, C., & Camussi, G. (2011). Microvesicles derived from human adult mesenchymal stem cells protect against ischaemia-reperfusion-induced acute and chronic kidney injury. *Nephrology, Dialysis, Transplantation: Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, *26*(5), 1474–1483. <https://doi.org/10.1093/NDT/GFR015>
- Gaugler, J., James, B., Johnson, T., Reimer, J., Scales, K., Tom, S., & Weuve, J. (2023). 2023 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia*. <https://doi.org/10.1002/alz.13016>
- Ge, F., Yang, H., Lu, W., Shi, H., Chen, Q., Luo, Y., Liu, L., & Yan, J. (2020). Ovariectomy Induces Microglial Cell Activation and Inflammatory Response in Rat Prefrontal Cortices to Accelerate the Chronic Unpredictable Stress-Mediated Anxiety and Depression. *BioMed Research International*, *2020*. <https://doi.org/10.1155/2020/3609758>
- Georgiou, P., Zanos, P., Mou, T. C. M., An, X., Gerhard, D. M., Dryanovski, D. I., Potter, L. E., Highland, J. N., Jenne, C. E., Stewart, B. W., Pultorak, K. J., Yuan, P., Powels, C. F., Lovett, J., Pereira, E. F. R., Clark, S. M., Tonelli, L. H., Moaddel, R., Zarate, C. A., ... Gould, T. D. (2022). Experimenters' sex modulates mouse behaviors and neural responses to ketamine via corticotropin releasing factor. *Nature Neuroscience*, *25*(9), 1191. <https://doi.org/10.1038/S41593-022-01146-X>
- Gilles, J. F., Dos Santos, M., Boudier, T., Bolte, S., & Heck, N. (2017). DiAna, an ImageJ tool for object-based 3D co-localization and distance analysis. *Methods*, *115*, 55–64. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2016.11.016>

- Gingeras, T. R., Sciaky, D., Gelinas, R. E., Bing-Dong, J., Yen, C. E., Kelly, M. M., Bullock, P. A., Parsons, B. L., O'Neill, K. E., & Roberts, R. J. (1982). Nucleotide sequences from the adenovirus-2 genome. *Journal of Biological Chemistry*, *257*(22).
- Goate, A., Chartier-Harlin, M. C., Mullan, M., Brown, J., Crawford, F., Fidani, L., Giuffra, L., Haynes, A., Irving, N., James, L., Mant, R., Newton, P., Rooke, K., Roques, P., Talbot, C., Pericak-Vance, M., Roses, A., Williamson, R., Rossor, M., ... Hardy, J. (1991). Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* *1991* *349*:6311, *349*(6311), 704–706. <https://doi.org/10.1038/349704a0>
- Gómez-Nicola, D., Fransen, N. L., Suzzi, S., & Hugh Perry, V. (2013). Regulation of Microglial Proliferation during Chronic Neurodegeneration. *The Journal of Neuroscience*, *33*(6), 2481. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4440-12.2013>
- Gould, E., Woolley, C. S., Frankfurt, M., & McEwen, B. S. (1990). Gonadal steroids regulate dendritic spine density in hippocampal pyramidal cells in adulthood. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *10*(4), 1286–1291. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.10-04-01286.1990>
- Goya, R. G., Reggiani, P. C., Vesenbeckh, S. M., Pléau, J. M., Sosa, Y. E., Cónsole, G. M., Schade, R., Henklein, P., & Dardenne, M. (2007). Thymulin gene therapy prevents the reduction in circulating gonadotropins induced by thymulin deficiency in mice. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, *293*(1), E182. <https://doi.org/10.1152/AJPENDO.00085.2007>
- Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C., & Nairn, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *The Journal of General Virology*, *36*(1), 59–72. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-36-1-59>
- Griffeth, R. J., Bianda, V., & Nef, S. (2014). The emerging role of insulin-like growth factors in testis development and function. In *Basic and Clinical Andrology* (Vol. 24, Issue 1). <https://doi.org/10.1186/2051-4190-24-12>
- Grünblatt, E., Hoyer, S., & Riederer, P. (2004). Gene expression profile in streptozotocin rat model for sporadic Alzheimer's disease. *Journal of Neural Transmission*, *111*(3). <https://doi.org/10.1007/s00702-003-0030-x>
- Grünblatt, E., Salkovic-Petrisic, M., Osmanovic, J., Riederer, P., & Hoyer, S. (2007). Brain insulin system dysfunction in streptozotocin intracerebroventricularly treated rats generates hyperphosphorylated tau protein. *Journal of Neurochemistry*, *101*(3), 757–770. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.04368.x>
- Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Tung, Y. C., Quinlan, M., Wisniewski, H. M., & Binder, L. I. (1986). Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *83*(13), 4913–4917. <https://doi.org/10.1073/PNAS.83.13.4913>
- Gubbi, S., Quipildor, G. F., Barzilai, N., Huffman, D. M., & Milman, S. (2018). 40 years of IGF1: IGF1: The Jekyll and Hyde of the aging brain. In *Journal of Molecular Endocrinology* (Vol. 61, Issue 1, pp. T171–T185). BioScientifica Ltd. <https://doi.org/10.1530/JME-18-0093>
- Guerreiro, R., Wojtas, A., Bras, J., Carrasquillo, M., Rogaeva, E., Majounie, E., Cruchaga, C., Sassi, C., Kauwe, J. S. K., Younkin, S., Hazrati, L., Collinge, J., Pocock, J., Lashley, T., Williams, J., Lambert, J.-C., Amouyel, P., Goate, A., Rademakers, R., ... Hardy, J. (2013). TREM2 variants in Alzheimer's disease. *The New England Journal of Medicine*, *368*(2), 117–127. <https://doi.org/10.1056/NEJMOA1211851>
- Guo, Z., Chen, Y., Mao, Y. F., Zheng, T., Jiang, Y., Yan, Y., Yin, X., & Zhang, B. (2017). Long-term treatment with intranasal insulin ameliorates cognitive impairment, tau hyperphosphorylation, and microglial activation in a streptozotocin-induced Alzheimer's rat model. *Scientific Reports*, *7*. <https://doi.org/10.1038/srep45971>

- Gur, R. C., Richard, J., Calkins, M. E., Chiavacci, R., Hansen, J. A., Bilker, W. B., Loughead, J., Connolly, J. J., Qiu, H., Mentch, F. D., Abou-Sleiman, P. M., Hakonarson, H., & Gur, R. E. (2012). Age group and sex differences in performance on a computerized neurocognitive battery in children age 8–21. *Neuropsychology, 26*(2), 251. <https://doi.org/10.1037/A0026712>
- Guthrie, K. M., Nguyen, T., & Gall, C. M. (1995). Insulin-like growth factor-1 mRNA is increased in deafferented hippocampus: Spatiotemporal correspondence of a trophic event with axon sprouting. *Journal of Comparative Neurology, 352*(1). <https://doi.org/10.1002/cne.903520111>
- Haass, C., & Selkoe, D. (2022). If amyloid drives Alzheimer disease, why have anti-amyloid therapies not yet slowed cognitive decline? *PLOS Biology, 20*(7), e3001694. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PBIO.3001694>
- Haber, M., Zhou, L., & Murai, K. K. (2006). Cooperative Astrocyte and Dendritic Spine Dynamics at Hippocampal Excitatory Synapses. *The Journal of Neuroscience, 26*(35), 8881. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1302-06.2006>
- Hadden, J. W. (1992). Thymic endocrinology. *International Journal of Immunopharmacology, 14*(3). [https://doi.org/10.1016/0192-0561\(92\)90163-F](https://doi.org/10.1016/0192-0561(92)90163-F)
- Hafting, T., Fyhn, M., Molden, S., Moser, M. B., & Moser, E. I. (2005). Microstructure of a spatial map in the entorhinal cortex. *Nature, 436*(7052). <https://doi.org/10.1038/nature03721>
- Haim, L. Ben, Carrillo-de Sauvage, M. A., Ceyzériat, K., & Escartin, C. (2015). Elusive roles for reactive astrocytes in neurodegenerative diseases. In *Frontiers in Cellular Neuroscience* (Vol. 9, Issue AUGUST). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00278>
- Haim, L. Ben, Ceyzériat, K., Sauvage, M. A. C. de, Aubry, F., Auregan, G., Guillermier, M., Ruiz, M., Petit, F., Houitte, D., Faivre, E., Vandesquille, M., Aron-Badin, R., Dhenain, M., Déglon, N., Hantraye, P., Brouillet, E., Bonvento, G., & Escartin, C. (2015). The JAK/STAT3 pathway is a common inducer of astrocyte reactivity in Alzheimer's and Huntington's diseases. *Journal of Neuroscience, 35*(6), 2817–2829. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3516-14.2015>
- Hamosh, M., & Hamosh, P. (1975). The effect of estrogen on the lipoprotein lipase activity of rat adipose tissue. *Journal of Clinical Investigation, 55*(5), 1132. <https://doi.org/10.1172/JCI108015>
- Han, V. K. M., Lund, P. K., Lee, D. C., & D' Ercole, A. J. (1988). Expression of Somatomedin/Insulin-Like Growth Factor Messenger Ribonucleic Acids in the Human Fetus: Identification, Characterization, and Tissue Distribution. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 66*(2), 422–429. <https://doi.org/10.1210/JCEM-66-2-422>
- Hansen, D. V., Hanson, J. E., & Sheng, M. (2018). Microglia in Alzheimer's disease. *The Journal of Cell Biology, 217*(2), 459. <https://doi.org/10.1083/JCB.201709069>
- Hardy, J. A., & Higgins, G. A. (1992). Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science (New York, N.Y.), 256*(5054), 184–185. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1566067>
- Harvey, R. J., Skelton-Robinson, M., & Rossor, M. N. (2003). The prevalence and causes of dementia in people under the age of 65 years. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry, 74*(9). <https://doi.org/10.1136/jnnp.74.9.1206>
- Hass, R., Kasper, C., Böhm, S., & Jacobs, R. (2011). Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Communication and Signaling : CCS, 9*, 12. <https://doi.org/10.1186/1478-811X-9-12>
- Hauzenberger, A. R., Gebhardt-Henrich, S. G., & Steiger, A. (2006). The influence of bedding depth on behaviour in golden hamsters (*Mesocricetus auratus*). *Applied Animal Behaviour Science, 100*(3–4), 280–294. <https://doi.org/10.1016/J.APPLANIM.2005.11.012>
- Havrankova, J., Roth, J., & Brownstein, M. (1978). Insulin receptors are widely distributed in the central nervous system of the rat. *Nature, 272*(5656), 827–829. <https://doi.org/10.1038/272827A0>
- Heneka, M. T., Carson, M. J., Khoury, J. El, Landreth, G. E., Brosseron, F., Feinstein, D. L., Jacobs, A. H., Wyss-Coray, T., Vitorica, J., Ransohoff, R. M., Herrup, K., Frautschy, S. A., Finsen, B., Brown, G. C.,

- Verkhatsky, A., Yamanaka, K., Koistinaho, J., Latz, E., Halle, A., ... Kummer, M. P. (2015). Neuroinflammation in Alzheimer's Disease. *The Lancet. Neurology*, 14(4), 388. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(15\)70016-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(15)70016-5)
- Heneka, M. T., Kummer, M. P., Stutz, A., Delekate, A., Schwartz, S., Vieira-Saecker, A., Griep, A., Axt, D., Remus, A., Tzeng, T. C., Gelpi, E., Halle, A., Korte, M., Latz, E., & Golenbock, D. T. (2013). NLRP3 is activated in Alzheimer's disease and contributes to pathology in APP/PS1 mice. *Nature*, 493(7434), 674. <https://doi.org/10.1038/NATURE11729>
- Heo, J. H., Lee, S. R., Lee, S. T., Lee, K. M., Oh, J. H., Jang, D. P., Chang, K. T., & Cho, Z. H. (2011). Spatial Distribution of Glucose Hypometabolism Induced by Intracerebroventricular Streptozotocin in Monkeys. *Journal of Alzheimer's Disease*, 25(3), 517–523. <https://doi.org/10.3233/JAD-2011-102079>
- Hereñú, C. B., Cristina, C., Rimoldi, O. J., Becú-Villalobos, D., Cambiaggi, V., Portiansky, E. L., & Goya, R. G. (2006). Restorative effect of insulin-like growth factor-I gene therapy in the hypothalamus of senile rats with dopaminergic dysfunction. *Gene Therapy* 2006 14:3, 14(3), 237–245. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3302870>
- Hereñú, C. B., Cristina, C., Rimoldi, O. J., Becú-Villalobos, D., Cambiaggi, V., Portiansky, E. L., & Goya, R. G. (2007). Restorative effect of insulin-like growth factor-I gene therapy in the hypothalamus of senile rats with dopaminergic dysfunction. *Gene Therapy*, 14(3), 237–245. <https://doi.org/10.1038/SJ.GT.3302870>
- Hereñú, C. B., Sonntag, W. E., Morel, G. R., Portiansky, E. L., & Goya, R. G. (2009). The ependymal route for insulin-like growth factor-1 gene therapy in the brain. *Neuroscience*, 163(1), 442–447. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROSCIENCE.2009.06.024>
- Herrup, K. (2015). The case for rejecting the amyloid cascade hypothesis. *Nature Neuroscience*, 18(6), 794–799. <https://doi.org/10.1038/nn.4017>
- Hickman, S. E., Allison, E. K., & El Khoury, J. (2008). Microglial dysfunction and defective beta-amyloid clearance pathways in aging Alzheimer's disease mice. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 28(33), 8354–8360. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0616-08.2008>
- Hindam, M. O., Sayed, R. H., Skalicka-Woźniak, K., Budzyńska, B., & EL Sayed, N. S. (2020). Xanthotoxin and umbelliferone attenuate cognitive dysfunction in a streptozotocin-induced rat model of sporadic Alzheimer's disease: The role of JAK2/STAT3 and Nrf2/HO-1 signalling pathway modulation. *Phytotherapy Research*, 34(9), 2351–2365. <https://doi.org/10.1002/ptr.6686>
- Hirvonen, J., Virtanen, K. A., Nummenmaa, L., Hannukainen, J. C., Honka, M. J., Bucci, M., Nesterov, S. V., Parkkola, R., Rinne, J., Iozzo, P., & Nuutila, P. (2011). Effects of Insulin on Brain Glucose Metabolism in Impaired Glucose Tolerance. *Diabetes*, 60(2), 443. <https://doi.org/10.2337/DB10-0940>
- Hogervorst, E. (2013). Effects of Gonadal Hormones on Cognitive Behaviour in Elderly Men and Women. *Journal of Neuroendocrinology*, 25(11), 1182–1195. <https://doi.org/10.1111/JNE.12080>
- Holtzman, D. M., Bales, K. R., Tenkova, T., Fagan, A. M., Parsadanian, M., Sartorius, L. J., Mackey, B., Olney, J., McKeel, D., Wozniak, D., & Paul, S. M. (2000). Apolipoprotein E isoform-dependent amyloid deposition and neuritic degeneration in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(6), 2892–2897. <https://doi.org/10.1073/PNAS.050004797>
- Hoyer, S. (1991). Abnormalities of glucose metabolism in Alzheimer's disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 640. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1991.tb00190.x>
- Hoyer, S., Oesterreich, K., & Wagner, O. (1988). Glucose metabolism as the site of the primary abnormality in early-onset dementia of Alzheimer type? *Journal of Neurology*, 235(3). <https://doi.org/10.1007/BF00314304>

- Hu, N., Yu, J. T., Tan, L., Wang, Y. L., Sun, L., & Tan, L. (2013). Nutrition and the risk of Alzheimer's disease. In *BioMed Research International* (Vol. 2013). <https://doi.org/10.1155/2013/524820>
- Hu, Z., Yang, Y., Gao, K., Rudd, J. A., & Fang, M. (2016). Ovarian hormones ameliorate memory impairment, cholinergic deficit, neuronal apoptosis and astrogliosis in a rat model of Alzheimer's disease. *Experimental and Therapeutic Medicine*, *11*(1), 89. <https://doi.org/10.3892/ETM.2015.2868>
- Huat, T. J., Khan, A. A., Pati, S., Mustafa, Z., Abdullah, J. M., & Jaafar, H. (2014). IGF-1 enhances cell proliferation and survival during early differentiation of mesenchymal stem cells to neural progenitor-like cells. *BMC Neuroscience*, *15*. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-15-91>
- Illum, L. (2000). Transport of drugs from the nasal cavity to the central nervous system. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, *11*(1), 1–18. [https://doi.org/10.1016/S0928-0987\(00\)00087-7](https://doi.org/10.1016/S0928-0987(00)00087-7)
- Ingalhalikar, M., Smith, A., Parker, D., Satterthwaite, T. D., Elliott, M. A., Ruparel, K., Hakonarson, H., Gur, R. E., Gur, R. C., & Verma, R. (2014). Sex differences in the structural connectome of the human brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(2), 823–828. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1316909110/ASSET/1CF26281-5D58-402C-8CC1-523603E1BD4C/ASSETS/GRAPHIC/PNAS.1316909110I6.GIF>
- Ishrat, T., Parveen, K., Khan, M. M., Khuwaja, G., Khan, M. B., Yousuf, S., Ahmad, A., Shrivastav, P., & Islam, F. (2009). Selenium prevents cognitive decline and oxidative damage in rat model of streptozotocin-induced experimental dementia of Alzheimer's type. *Brain Research*, *1281*, 117–127. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRES.2009.04.010>
- J.A. Kaye, T. Swihart, D. Howieson, A. Dame, M.M. Moore, T. Karnos, R. Camicioli, M. Ball, B. Oken, & G. Sexton. (1997). Volume loss of the hippocampus and temporal lobe in healthy elderly persons destined to develop dementia. *Neurology*.
- Jablonka, S., Holtmann, B., Sendtner, M., & Metzger, F. (2011). Therapeutic effects of PEGylated insulin-like growth factor I in the pmn mouse model of motoneuron disease. *Experimental Neurology*, *232*(2), 261–269. <https://doi.org/10.1016/J.EXPNEUROL.2011.09.015>
- Jack, C. R., Barkhof, F., Bernstein, M. A., Cantillon, M., Cole, P. E., Decarli, C., Dubois, B., Duchesne, S., Fox, N. C., Frisoni, G. B., Hampel, H., Hill, D. L. G., Johnson, K., Mangin, J. F., Scheltens, P., Schwarz, A. J., Sperling, R., Suhy, J., Thompson, P. M., ... Foster, N. L. (2011). Steps to standardization and validation of hippocampal volumetry as a biomarker in clinical trials and diagnostic criteria for Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association*, *7*(4), 474. <https://doi.org/10.1016/J.JALZ.2011.04.007>
- Jacob, C. P., Koutsilieris, E., Bartl, J., Neuen-Jacob, E., Arzberger, T., Zander, N., Ravid, R., Roggendorf, W., Riederer, P., & Grünblatt, E. (2007). Alterations in expression of glutamatergic transporters and receptors in sporadic Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, *11*(1). <https://doi.org/10.3233/JAD-2007-11113>
- Jana, M., Anderson, J. A., Saha, R. N., Liu, X., & Pahan, K. (2005). Regulation of inducible nitric oxide synthase in proinflammatory cytokine-stimulated human primary astrocytes. *Free Radical Biology and Medicine*, *38*(5). <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.11.021>
- Jaramillo, M., Gowda, D. C., Radzioch, D., & Olivier, M. (2003). Hemozoin Increases IFN- γ -Inducible Macrophage Nitric Oxide Generation Through Extracellular Signal-Regulated Kinase- and NF- κ B-Dependent Pathways. *The Journal of Immunology*, *171*(8), 4243–4253. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.171.8.4243>
- Jay, T. R., Miller, C. M., Cheng, P. J., Graham, L. C., Bemiller, S., Broihier, M. L., Xu, G., Margevicius, D., Karlo, J. C., Sousa, G. L., Cotleur, A. C., Butovsky, O., Bekris, L., Staugaitis, S. M., Leverenz, J. B., Pimplikar, S. W., Landreth, G. E., Howell, G. R., Ransohoff, R. M., & Lamb, B. T. (2015). TREM2 deficiency eliminates TREM2+ inflammatory macrophages and ameliorates pathology in Alzheimer's disease mouse models. *The Journal of Experimental Medicine*, *212*(3), 287. <https://doi.org/10.1084/JEM.20142322>

- Jeganathan, S., Hascher, A., Chinnathambi, S., Biernat, J., Mandelkow, E. M., & Mandelkow, E. (2008). Proline-directed pseudo-phosphorylation at AT8 and PHF1 epitopes induces a compaction of the paperclip folding of tau and generates a pathological (MC-1) conformation. *Journal of Biological Chemistry*, 283(46), 32066–32076. <https://doi.org/10.1074/jbc.M805300200>
- Jett, S., Malviya, N., Schelbaum, E., Jang, G., Jahan, E., Clancy, K., Hristov, H., Pahlajani, S., Niotis, K., Loeb-Zeitlin, S., Havryliuk, Y., Isaacson, R., Brinton, R. D., & Mosconi, L. (2022). Endogenous and Exogenous Estrogen Exposures: How Women’s Reproductive Health Can Drive Brain Aging and Inform Alzheimer’s Prevention. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 14. <https://doi.org/10.3389/FNAGI.2022.831807>
- Jonsson, T., Stefansson, H., Steinberg, S., Jonsdottir, I., Jonsson, P. V., Snaedal, J., Bjornsson, S., Huttenlocher, J., Levey, A. I., Lah, J. J., Rujescu, D., Hampel, H., Giegling, I., Andreassen, O. A., Engedal, K., Ulstein, I., Djurovic, S., Ibrahim-Verbaas, C., Hofman, A., ... Stefansson, K. (2013). Variant of TREM2 Associated with the Risk of Alzheimer’s Disease. *The New England Journal of Medicine*, 368(2), 107. <https://doi.org/10.1056/NEJMOA1211103>
- Jorm, A. F. (2001). History of Depression as a Risk Factor for Dementia: An Updated Review. <http://Dx.Doi.Org/10.1046/j.1440-1614.2001.00967.x>, 35(6), 776–781. <https://doi.org/10.1046/J.1440-1614.2001.00967.X>
- Jost, B. C., & Grossberg, G. T. (1995). The Natural History of Alzheimer’s Disease: A Brain Bank Study. *Journal of the American Geriatrics Society*, 43(11), 1248–1255. <https://doi.org/10.1111/J.1532-5415.1995.TB07401.X>
- Jure, I., Lockhart, E. F., De Nicola, A. F., Bellini, M. J., & Labombarda, F. (2021). IGF1 Gene Therapy Reversed Cognitive Deficits and Restored Hippocampal Alterations After Chronic Spinal Cord Injury. *Molecular Neurobiology*, 58(12). <https://doi.org/10.1007/s12035-021-02545-0>
- Justicia, C., Gabriel, C., & Planas, A. M. (2000). Activation of the JAK/STAT pathway following transient focal cerebral ischemia: Signaling through Jak1 and Stat3 in astrocytes. *Glia*, 30(3), 253–270. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1136\(200005\)30:3<253::AID-GLIA5>3.0.CO;2-O](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1136(200005)30:3<253::AID-GLIA5>3.0.CO;2-O)
- Kamphuis, W., Orre, M., Kooijman, L., Dahmen, M., & Hol, E. M. (2012a). Differential cell proliferation in the cortex of the APPswePS1dE9 Alzheimer’s disease mouse model. *GLIA*, 60(4). <https://doi.org/10.1002/glia.22295>
- Kamphuis, W., Orre, M., Kooijman, L., Dahmen, M., & Hol, E. M. (2012b). Differential cell proliferation in the cortex of the appsweps1de9 alzheimer’s disease mouse model. *Glia*, 60(4), 615–629. <https://doi.org/10.1002/GLIA.22295>
- Kanaan, S. A., Safieh-Garabedian, B., Karam, M., Khansa, H., Jabbur, S. J., Jurjus, A. R., & Saade, N. E. (2002). Thymulin reduces the hyperalgesia and cytokine upregulation induced by cutaneous leishmaniasis in mice. *Brain, Behavior, and Immunity*, 16(4). <https://doi.org/10.1006/brbi.2001.0631>
- Karahuseyinoglu, S., Cinar, O., Kilic, E., Kara, F., Gumus Akay, G., Özel Demiralp, D., Tukun, A., Uckan, D., Can, A., & Demiralp, Z. (2007). Biology of Stem Cells in Human Umbilical Cord Stroma: In Situ and In Vitro Surveys. *Stem Cells*, 25(2), 319–331. <https://doi.org/10.1634/STEMCELLS.2006-0286>
- Karpf, J., Unichenko, P., Chalmers, N., Beyer, F., Wittmann, M. T., Schneider, J., Fidan, E., Reis, A., Beckervordersandforth, J., Brandner, S., Liebner, S., Falk, S., Sagner, A., Henneberger, C., & Beckervordersandforth, R. (2022). Dentate gyrus astrocytes exhibit layer-specific molecular, morphological and physiological features. *Nature Neuroscience*, 25(12), 1626–1638. <https://doi.org/10.1038/s41593-022-01192-5>
- Kato, H., Faria, T. N., Stannard, B., Roberts, C. T., & LeRoith, D. (1994). Essential role of tyrosine residues 1131, 1135, and 1136 of the insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptor in IGF-I action. *Molecular Endocrinology*, 8(1). <https://doi.org/10.1210/mend.8.1.7512194>
- Kesner, R. P. (1988). Reevaluation of the contribution of the basal forebrain cholinergic system to memory. In *Neurobiology of Aging* (Vol. 9, Issue C). [https://doi.org/10.1016/S0197-4580\(88\)80122-2](https://doi.org/10.1016/S0197-4580(88)80122-2)

- Keyser, J. De, Wilczak, N., & Goossens, A. (1994). Insulin-like growth factor-I receptor densities in human frontal cortex and white matter during aging, in Alzheimer's disease, and in Huntington's disease. *Neuroscience Letters*, 172(1–2). [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(94\)90670-X](https://doi.org/10.1016/0304-3940(94)90670-X)
- Keyzers, C., Knapska, E., Moita, M. A., & Gazzola, V. (2022). Emotional contagion and prosocial behavior in rodents. In *Trends in Cognitive Sciences* (Vol. 26, Issue 8). <https://doi.org/10.1016/j.tics.2022.05.005>
- Kim, H., & Kim, J. S. (2014). A guide to genome engineering with programmable nucleases. *Nature Reviews Genetics* 2014 15:5, 15(5), 321–334. <https://doi.org/10.1038/nrg3686>
- Kim, K. S., Kim, H. S., Park, J. M., Kim, H. W., Park, M. kyung, Lee, H. S., Lim, D. S., Lee, T. H., Chopp, M., & Moon, J. (2013). Long-term immunomodulatory effect of amniotic stem cells in an alzheimer's disease model. *Neurobiology of Aging*, 34(10). <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2013.03.029>
- Kiris, E., Ventimiglia, D., Sargin, M. E., Gaylord, M. R., Altinok, A., Rose, K., Manjunath, B. S., Jordan, M. A., Wilson, L., & Feinstein, S. C. (2011). Combinatorial Tau Pseudophosphorylation: MARKEDLY DIFFERENT REGULATORY EFFECTS ON MICROTUBULE ASSEMBLY AND DYNAMIC INSTABILITY THAN THE SUM OF THE INDIVIDUAL PARTS*. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(16), 14257. <https://doi.org/10.1074/JBC.M111.219311>
- Kleinberger, G., Yamanishi, Y., Suárez-Calvet, M., Czirr, E., Lohmann, E., Cuyvers, E., Struyfs, H., Pettkus, N., Wenninger-Weinzierl, A., Mazaheri, F., Tahirovic, S., Lleó, A., Alcolea, D., Fortea, J., Willem, M., Lammich, S., Molinuevo, J. L., Sánchez-Valle, R., Antonell, A., ... Haass, C. (2014). TREM2 mutations implicated in neurodegeneration impair cell surface transport and phagocytosis. *Science Translational Medicine*, 6(243). https://doi.org/10.1126/SCITRANSLMED.3009093/SUPPL_FILE/6-243RA86_SM.PDF
- Klunk, W. E., Mathis, C. A., Price, J. C., DeKosky, S. T., Lopresti, B. J., Tsopelas, N. D., Saxton, J. A., & Nebes, R. D. (2009). Amyloid Imaging with PET in Alzheimer's Disease, Mild Cognitive Impairment, and Clinically Unimpaired Subjects. *PET in the Evaluation of Alzheimer's Disease and Related Disorders*, 119–147. https://doi.org/10.1007/978-0-387-76420-7_6
- Knezovic, A., Osmanovic-Barilar, J., Curlin, M., Hof, P. R., Simic, G., Riederer, P., & Salkovic-Petrisic, M. (2015). Staging of cognitive deficits and neuropathological and ultrastructural changes in streptozotocin-induced rat model of Alzheimer's disease. *Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria : 1996)*, 122(4), 577–592. <https://doi.org/10.1007/S00702-015-1394-4>
- Krabbe, G., Halle, A., Matyash, V., Rinnenthal, J. L., Eom, G. D., Bernhardt, U., Miller, K. R., Prokop, S., Kettenmann, H., & Heppner, F. L. (2013). Functional Impairment of Microglia Coincides with Beta-Amyloid Deposition in Mice with Alzheimer-Like Pathology. *PLoS ONE*, 8(4). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0060921>
- Kramár, E. A., Chen, L. Y., Brandon, N. J., Rex, C. S., Liu, F., Gall, C. M., & Lynch, G. (2009). Cytoskeletal Changes Underlie Estrogen's Acute Effects on Synaptic Transmission and Plasticity. *The Journal of Neuroscience*, 29(41), 12982. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3059-09.2009>
- Kraska, A., Santin, M. D., Dorieux, O., Joseph-Mathurin, N., Bourrin, E., Petit, F., Jan, C., Chaigneau, M., Hantraye, P., Lestage, P., & Dhenain, M. (2012). In Vivo Cross-sectional Characterization of Cerebral Alterations Induced by Intracerebroventricular Administration of Streptozotocin. *PLoS ONE*, 7(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046196>
- Kucheryavykh, Y. V., Kucheryavykh, L. Y., Nichols, C. G., Maldonado, H. M., Baksi, K., Reichenbach, A., Skatchkov, S. N., & Eaton, M. J. (2007). Downregulation of Kir4.1 inward rectifying potassium channel subunits by RNAi impairs potassium transfer and glutamate uptake by cultured cortical astrocytes. *Glia*, 55(3), 274–281. <https://doi.org/10.1002/GLIA.20455>

- Kumar, M., & Bansal, N. (2018). Caffeic acid phenethyl ester rescued streptozotocin-induced memory loss through PI3-kinase dependent pathway. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, *101*, 162–173. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.02.089>
- Kuźma, E., Lourida, I., Moore, S. F., Levine, D. A., Ukoumunne, O. C., & Llewellyn, D. J. (2018). Stroke and dementia risk: A systematic review and meta-analysis. *Alzheimer's & Dementia : The Journal of the Alzheimer's Association*, *14*(11), 1416. <https://doi.org/10.1016/J.JALZ.2018.06.3061>
- LaFerla, F. M., Green, K. N., & Oddo, S. (2007). Intracellular amyloid- β in Alzheimer's disease. In *Nature Reviews Neuroscience* (Vol. 8, Issue 7, pp. 499–509). <https://doi.org/10.1038/nrn2168>
- Lai, R. C., Chen, T. S., & Lim, S. K. (2011). Mesenchymal stem cell exosome: A novel stem cell-based therapy for cardiovascular disease. *Regenerative Medicine*, *6*(4), 481–492. <https://doi.org/10.2217/RME.11.35/ASSET/IMAGES/LARGE/FIGURE2.JPEG>
- Lannert, H., & Hoyer, S. (1998). Intracerebroventricular Administration of Streptozotocin Causes Long-Term Diminutions in Learning and Memory Abilities and in Cerebral Energy Metabolism in Adult Rats. In *Behavioral Neuroscience* (Vol. 112, Issue 5).
- Laron, Z. (2004). Laron Syndrome (Primary Growth Hormone Resistance or Insensitivity): The Personal Experience 1958-2003. In *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* (Vol. 89, Issue 3). <https://doi.org/10.1210/jc.2003-031033>
- Lee, C. C., Huang, C. C., & Hsu, K. Sen. (2011). Insulin promotes dendritic spine and synapse formation by the PI3K/Akt/mTOR and Rac1 signaling pathways. *Neuropharmacology*, *61*(4). <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.06.003>
- Lee, H. J., Lee, J. K., Lee, H., Carter, J. E., Chang, J. W., Oh, W., Yang, Y. S., Suh, J. G., Lee, B. H., Jin, H. K., & Bae, J. sung. (2012). Human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells improve neuropathology and cognitive impairment in an Alzheimer's disease mouse model through modulation of neuroinflammation. *Neurobiology of Aging*, *33*(3), 588–602. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2010.03.024>
- Lee, W. H., Wang, G. M., Seaman, L. B., & Vannucci, S. J. (1996). Coordinate IGF-I and IGFBP5 gene expression in perinatal rat brain after hypoxia-ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, *16*(2). <https://doi.org/10.1097/00004647-199603000-00007>
- Lepore, A. C., Dejea, C., Carmen, J., Rauck, B., Kerr, D. A., Sofroniew, M. V., & Maragakis, N. J. (2008). Selective Ablation of Proliferating Astrocytes Does Not Affect Disease Outcome in either Acute or Chronic Models of Motor Neuron Degeneration. *Experimental Neurology*, *211*(2), 423. <https://doi.org/10.1016/J.EXPNEUROL.2008.02.020>
- 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.*
- Levy, D. E., & Darnell, J. E. (2002). STATs: Transcriptional control and biological impact. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 3, Issue 9, pp. 651–662). <https://doi.org/10.1038/nrm909>
- Ley, C. J., Lees, B., & Stevenson, J. C. (1992). Sex- and menopause-associated changes in body-fat distribution. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *55*(5), 950–954. <https://doi.org/10.1093/AJCN/55.5.950>
- Li, C., Liu, W., Li, X., Zhang, Z., Qi, H., Liu, S., Yan, N., Xing, Y., Hölscher, C., & Wang, Z. (2020). The novel GLP-1/GIP analogue DA5-CH reduces tau phosphorylation and normalizes theta rhythm in the icv. STZ rat model of AD. *Brain and Behavior*, *10*(3). <https://doi.org/10.1002/brb3.1505>
- Liddelw, S. A., Guttenplan, K. A., Clarke, L. E., Bennett, F. C., Bohlen, C. J., Schirmer, L., Bennett, M. L., Münch, A. E., Chung, W. S., Peterson, T. C., Wilton, D. K., Frouin, A., Napier, B. A., Panicker, N., Kumar, M., Buckwalter, M. S., Rowitch, D. H., Dawson, V. L., Dawson, T. M., ... Barres, B. A. (2017). Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature*, *541*(7638), 481–487. <https://doi.org/10.1038/nature21029>

- Lippa, C. F., Saunders, A. M., Smith, T. W., Swearer, J. M., Drachman, D. A., Ghetti, B., Nee, L., Pulaski-Salo, D., Dickson, D., Robitaille, Y., Bergeron, C., Crain, B., Benson, M. D., Farlow, M., Hyman, B. T., St. George-Hyslop, P., Roses, A. D., & Pollen, D. A. (1996). Familial and sporadic Alzheimer's disease: neuropathology cannot exclude a final common pathway. *Neurology*, *46*(2), 406–412. <https://doi.org/10.1212/WNL.46.2.406>
- Liu, F., Day, M., Muñoz, L. C., Bitran, D., Arias, R., Revilla-Sanchez, R., Grauer, S., Zhang, G., Kelley, C., Pulito, V., Sung, A., Mervis, R. F., Navarra, R., Hirst, W. D., Reinhart, P. H., Marquis, K. L., Moss, S. J., Pangalos, M. N., & Brandon, N. J. (2008). Activation of estrogen receptor- β regulates hippocampal synaptic plasticity and improves memory. *Nature Neuroscience* *2008* *11*:3, *11*(3), 334–343. <https://doi.org/10.1038/nn2057>
- Liu, H., Sun, X., Gong, X., & Wang, G. (2019). Human umbilical cord mesenchymal stem cells derived exosomes exert antiapoptosis effect via activating PI3K/Akt/mTOR pathway on H9C2 cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, *120*(9), 14455–14464. <https://doi.org/10.1002/JCB.28705>
- Liu, L., Drouet, V., Wu, J. W., Witter, M. P., Small, S. A., Clelland, C., & Duff, K. (2012). Trans-synaptic spread of tau pathology in vivo. *PLoS ONE*, *7*(2). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0031302>
- Logroscino, G., Kang, J. H., & Grodstein, F. (2004). Prospective study of type 2 diabetes and cognitive decline in women aged 70–81 years. *British Medical Journal*, *328*(7439). <https://doi.org/10.1136/bmj.37977.495729.ee>
- López Rodríguez, A. B., Mateos Vicente, B., Romero-Zerbo, S. Y., Rodríguez-Rodríguez, N., Bellini, M. J., Rodríguez De Fonseca, F., Bermudez-Silva, F. J., Azcoitia, I., Garcia-Segura, L. M., & Viveros, M. P. (2011). Estradiol decreases cortical reactive astrogliosis after brain injury by a mechanism involving cannabinoid receptors. *Cerebral Cortex (New York, N.Y.: 1991)*, *21*(9), 2046–2055. <https://doi.org/10.1093/CERCOR/BHQ277>
- Lu, X., Ma, L., Ruan, L., Kong, Y., Mou, H., Zhang, Z., Wang, Z., Wang, J. M., & Le, Y. (2010). Resveratrol differentially modulates inflammatory responses of microglia and astrocytes. *Journal of Neuroinflammation*, *7*. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-7-46>
- Lu, Y., Dong, Y., Tucker, D., Wang, R., Ahmed, M. E., Brann, D., & Zhang, Q. (2017). Treadmill Exercise Exerts Neuroprotection and Regulates Microglial Polarization and Oxidative Stress in a Streptozotocin-Induced Rat Model of Sporadic Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, *56*(4), 1469–1484. <https://doi.org/10.3233/JAD-160869>
- Luders, E., Narr, K. L., Thompson, P. M., Rex, D. E., Woods, R. P., DeLuca, H., Jancke, L., & Toga, A. W. (2006). Gender effects on cortical thickness and the influence of scaling. *Human Brain Mapping*, *27*(4). <https://doi.org/10.1002/hbm.20187>
- Lue, L. F., Kuo, Y. M., Roher, A. E., Brachova, L., Shen, Y., Sue, L., Beach, T., Kurth, J. H., Rydel, R. E., & Rogers, J. (1999). Soluble amyloid beta peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease. *The American Journal of Pathology*, *155*(3), 853–862. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)65184-X](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65184-X)
- Luine, V. N., Jacome, L. F., & Maclusky, N. J. (2003). Rapid enhancement of visual and place memory by estrogens in rats. *Endocrinology*, *144*(7). <https://doi.org/10.1210/en.2003-0004>
- Lusky, M., Christ, M., Rittner, K., Dieterle, A., Dreyer, D., Mourot, B., Schultz, H., Stoeckel, F., Pavirani, A., & Mehtali, M. (1998). In Vitro and In Vivo Biology of Recombinant Adenovirus Vectors with E1, E1/E2A, or E1/E4 Deleted. *Journal of Virology*, *72*(3), 2022. <https://doi.org/10.1128/JVI.72.3.2022-2032.1998>
- Lynch, H. E., Goldberg, G. L., Chidgey, A., Van den Brink, M. R. M., Boyd, R., & Sempowski, G. D. (2009). Thymic involution and immune reconstitution. *Trends in Immunology*, *30*(7), 366. <https://doi.org/10.1016/J.IT.2009.04.003>

- Majore, I., Moretti, P., Stahl, F., Hass, R., & Kasper, C. (2011). Growth and Differentiation Properties of Mesenchymal Stromal Cell Populations Derived from Whole Human Umbilical Cord. *Stem Cell Reviews and Reports*, 7(1), 17–31. <https://doi.org/10.1007/s12015-010-9165-y>
- Maki, P. M., & Henderson, V. W. (2012). Hormone therapy, dementia, and cognition: the Women's Health Initiative ten years on. *Climacteric : The Journal of the International Menopause Society*, 15(3), 256. <https://doi.org/10.3109/13697137.2012.660613>
- MANN, D. M. A., YATES, P. O., & MARCYNLUK, B. (1984). Alzheimer's presenile dementia, senile dementia of Alzheimer type and Down's syndrome in middle age form an age related continuum of pathological changes. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 10(3), 185–207. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2990.1984.TB00351.X>
- Marchesi, V. T. (2011). Alzheimer's dementia begins as a disease of small blood vessels, damaged by oxidative-induced inflammation and dysregulated amyloid metabolism: implications for early detection and therapy. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 25(1), 5–13. <https://doi.org/10.1096/FJ.11-0102UFM>
- Marlatt, M. W., Bauer, J., Aronica, E., Van Haastert, E. S., Hoozemans, J. J. M., Joels, M., & Lucassen, P. J. (2014). Proliferation in the alzheimer hippocampus is due to microglia, not astroglia, and occurs at sites of amyloid deposition. *Neural Plasticity*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/693851>
- Martínez, H. R., Molina-Lopez, J. F., González-Garza, M. T., Moreno-Cuevas, J. E., Caro-Osorio, E., Gil-Valadez, A., Gutierrez-Jimenez, E., Zazueta-Fierro, O. E., Alfonso Meza, J., Couret-Alcaraz, P., & Hernandez-Torre, M. (2013). The immunosuppressive effect of mesenchymal stromal cells on B lymphocytes is mediated by membrane vesicles. *Cell Transplantation*, 22(2), 1899–1907. <https://doi.org/10.3727/096368911X582769>
- Masliah, E., Alford, M., Deteresa, R., Mallory, M., & Hansen, L. (1996). *Deficient Glutamate Transport Is Associated*.
- Masters, C. L., Bateman, R., Blennow, K., Rowe, C. C., Sperling, R. A., & Cummings, J. L. (2015). Alzheimer's disease. *Nature Reviews Disease Primers* 2015 1:1, 1(1), 1–18. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.56>
- McCarthy, M. M., & Arnold, A. P. (2011). Reframing sexual differentiation of the brain. *Nature Neuroscience*, 14(6), 677. <https://doi.org/10.1038/NN.2834>
- McElroy, J. F., & Wade, G. N. (1987). Short- and long-term effects of ovariectomy on food intake, body weight, carcass composition, and brown adipose tissue in rats. *Physiology & Behavior*, 39(3), 361–365. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(87\)90235-6](https://doi.org/10.1016/0031-9384(87)90235-6)
- McGEER, P. L., ITAGAKI, S., TAGO, H., & McGEER, E. G. (1988). Occurrence of HLA-DR Reactive Microglia in Alzheimer's Disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 540(1), 319–323. <https://doi.org/10.1111/J.1749-6632.1988.TB27086.X>
- McGrory, W. J., Bautista, D. S., & Graham, F. L. (1988). A simple technique for the rescue of early region I mutations into infectious human adenovirus type 5. *Virology*, 163(2). [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(88\)90302-9](https://doi.org/10.1016/0042-6822(88)90302-9)
- McLean, C. A., Cherny, R. A., Fraser, F. W., Fuller, S. J., Smith, M. J., Beyreuther, K., Bush, A., & Masters, C. L. (1999). Soluble pool of Aβ amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease - McLean - 1999 - *Annals of Neurology* - Wiley Online Library. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/1531-8249%28199912%2946%3A6%3C860%3A%3AAID-ANA8%3E3.0.CO%3B2-M?sid=nlm%3Apubmed>
- McNay, E. C., Ong, C. T., McCrimmon, R. J., Cresswell, J., Bogan, J. S., & Sherwin, R. S. (2010). Hippocampal memory processes are modulated by insulin and high-fat-induced insulin resistance. *Neurobiology of Learning and Memory*, 93(4), 546. <https://doi.org/10.1016/J.NLM.2010.02.002>
- Mebratu, Y., & Tesfaigzi, Y. (2009). How ERK1/2 Activation Controls Cell Proliferation and Cell Death Is Subcellular Localization the Answer? *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 8(8), 1168. <https://doi.org/10.4161/CC.8.8.8147>

- Mehta, D., Jackson, R., Paul, G., Shi, J., & Sabbagh, M. (2017). Why do trials for Alzheimer's disease drugs keep failing? A discontinued drug perspective for 2010–2015. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 26(6), 735. <https://doi.org/10.1080/13543784.2017.1323868>
- Méndez-González, M. P., Rivera-Aponte, D. E., Benedikt, J., Maldonado-Martínez, G., Tejeda-Bayron, F., Skatchkov, S. N., & Eaton, M. J. (2020). Downregulation of astrocytic kir4.1 potassium channels is associated with hippocampal neuronal hyperexcitability in type 2 diabetic mice. *Brain Sciences*, 10(2). <https://doi.org/10.3390/brainsci10020072>
- Misra, S., Tiwari, V., Kuhad, A., & Chopra, K. (2011). Modulation of nitrenergic pathway by sesamol prevents cognitive deficits and associated biochemical alterations in intracerebroventricular streptozotocin administered rats. *European Journal of Pharmacology*, 659(2–3), 177–186. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2011.03.026>
- Moloney, A. M., Griffin, R. J., Timmons, S., O'Connor, R., Ravid, R., & O'Neill, C. (2010). Defects in IGF-1 receptor, insulin receptor and IRS-1/2 in Alzheimer's disease indicate possible resistance to IGF-1 and insulin signalling. *Neurobiology of Aging*, 31(2), 224–243. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2008.04.002>
- Montine, T. J., Phelps, C. H., Beach, T. G., Bigio, E. H., Cairns, N. J., Dickson, D. W., Duyckaerts, C., Frosch, M. P., Masliah, E., Mirra, S. S., Nelson, P. T., Schneider, J. A., Thal, D. R., Trojanowski, J. Q., Vinters, H. V., & Hyman, B. T. (2012). National Institute on Aging-Alzheimer's Association guidelines for the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease: a practical approach. *Acta Neuropathologica*, 123(1), 1. <https://doi.org/10.1007/S00401-011-0910-3>
- Montivero, A. J., Gherzi, M. S., Silvero, C. M. J., Artur de la Villarmois, E., Catalan-Figueroa, J., Herrera, M., Becerra, M. C., Hereñú, C. B., & Pérez, M. F. (2021). Early IGF-1 Gene Therapy Prevented Oxidative Stress and Cognitive Deficits Induced by Traumatic Brain Injury. *Frontiers in Pharmacology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.672392>
- Moreels, M., Vandenabeele, F., Dumont, D., Robben, J., & Lambrechts, I. (2008). Alpha-smooth muscle actin (alpha-SMA) and nestin expression in reactive astrocytes in multiple sclerosis lesions: potential regulatory role of transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta1). *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 34(5), 532–546. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2990.2007.00910.X>
- Morel, G. R., Brown, O. A., Reggiani, P. C., Hereñú, C. B., Portiansky, E. L., Zuccolilli, G. O., Pléau, J. M., Dardenne, M., & Goya, R. G. (2006). Peripheral and mesencephalic transfer of a synthetic gene for the thymic peptide thymulin. *Brain Research Bulletin*, 69(6), 647–651. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2006.03.015>
- Morrison, J. H., Brinton, R. D., Schmidt, P. J., & Gore, A. C. (2006). Symposium: Estrogen, Menopause, and the Aging Brain: How Basic Neuroscience Can Inform Hormone Therapy in Women. *The Journal of Neuroscience*, 26(41), 10332. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3369-06.2006>
- Moschos, S. J., & Mantzoros, C. S. (2002). The role of the IGF system in cancer: From basic to clinical studies and clinical applications. In *Oncology* (Vol. 63, Issue 4). <https://doi.org/10.1159/000066230>
- Mosconi, L., Berti, V., Guyara-Quinn, C., McHugh, P., Petrongolo, G., Osorio, R. S., Connaughty, C., Pupi, A., Vallabhajosula, S., Isaacson, R. S., De Leon, M. J., Swerdlow, R. H., & Brinton, R. D. (2017). Perimenopause and emergence of an Alzheimer's bioenergetic phenotype in brain and periphery. *PLoS ONE*, 12(10). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0185926>
- Moser, E., Moser, M. B., & Andersen, P. (1993). Spatial learning impairment parallels the magnitude of dorsal hippocampal lesions, but is hardly present following ventral lesions. *The Journal of Neuroscience*, 13(9), 3916. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.13-09-03916.1993>
- Moser, M. B., Moser, E. I., Forrest, E., Andersen, P., & Morris, R. G. M. (1995). Spatial learning with a minislab in the dorsal hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(21), 9697. <https://doi.org/10.1073/PNAS.92.21.9697>

- Motte, J., & Williams, R. S. (1989). Age-related changes in the density and morphology of plaques and neurofibrillary tangles in Down syndrome brain. *Acta Neuropathologica*, 77(5), 535–546. <https://doi.org/10.1007/BF00687256>
- Mukherjee, J., Cardarelli, R. A., Cantaut-Belarif, Y., Deeb, T. Z., Srivastava, D. P., Tyagarajan, S. K., Pangalos, M. N., Triller, A., Maguire, J., Brandon, N. J., & Moss, S. J. (2017). Estradiol modulates the efficacy of synaptic inhibition by decreasing the dwell time of GABAA receptors at inhibitory synapses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(44), 11763–11768. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1705075114/-/DCSUPPLEMENTAL>
- Mumby, D. G. (2001). Perspectives on object-recognition memory following hippocampal damage: lessons from studies in rats. *Behavioural Brain Research*, 127(1–2). [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(01\)00367-9](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(01)00367-9)
- Munoz, J. R., Stoutenger, B. R., Robinson, A. P., Spees, J. L., & Prockop, D. J. (2005). Human stem/progenitor cells from bone marrow promote neurogenesis of endogenous neural stem cells in the hippocampus of mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(50), 18171–18176. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0508945102/ASSET/8FAD46B3-A3F6-41ED-8D71-ED89BCFC3FCE/ASSETS/GRAPHIC/ZPQ0490504020005.JPEG>
- Nakamura, T., & Lipton, S. A. (2011). S-nitrosylation of critical protein thiols mediates protein misfolding and mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases. *Antioxidants and Redox Signaling*, 14(8). <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3570>
- Nathan, C., Calingasan, N., Nezezon, J., Ding, A., Lucia, M. S., La Perle, K., Fuortes, M., Lin, M., Ehrt, S., Nyoun, S. K., Chen, J., Vodovotz, Y., Kipiani, K., & Beal, M. F. (2005). Protection from Alzheimer's-like disease in the mouse by genetic ablation of inducible nitric oxide synthase. *Journal of Experimental Medicine*, 202(9). <https://doi.org/10.1084/jem.20051529>
- Navarro, V., Sanchez-Mejias, E., Jimenez, S., Muñoz-Castro, C., Sanchez-Varo, R., Davila, J. C., Vizuite, M., Gutierrez, A., & Vitorica, J. (2018). Microglia in Alzheimer's disease: Activated, dysfunctional or degenerative. In *Frontiers in Aging Neuroscience* (Vol. 10, Issue MAY). <https://doi.org/10.3389/fnagi.2018.00140>
- Nestor, P. J., Fryer, T. D., & Hodges, J. R. (2006). Declarative memory impairments in Alzheimer's disease and semantic dementia. *NeuroImage*, 30(3), 1010–1020. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROIMAGE.2005.10.008>
- Netchine, I., Azzi, S., Le Bouc, Y., & Savage, M. O. (2011). IGF1 molecular anomalies demonstrate its critical role in fetal, postnatal growth and brain development. *Best Practice & Research. Clinical Endocrinology & Metabolism*, 25(1), 181–190. <https://doi.org/10.1016/J.BEEM.2010.08.005>
- Newell, K. L., Hyman, B. T., Growdon, J. H., & Hedley-Whyte, E. T. (1999). Application of the National Institute on Aging (NIA)-Reagan Institute Criteria for the Neuropathological Diagnosis of Alzheimer Disease. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 58(11), 1147–1155. <https://doi.org/10.1097/00005072-199911000-00004>
- Niewiadomska, G., Baksalerska-Pazera, M., & Riedel, G. (2009). The septo-hippocampal system, learning and recovery of function. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 33(5). <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2009.03.039>
- Nilsen, J., Irwin, R. W., Gallaher, T. K., & Brinton, R. D. (2007). Estradiol In Vivo Regulation of Brain Mitochondrial Proteome. *The Journal of Neuroscience*, 27(51), 14069. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4391-07.2007>
- Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., & Helmchen, F. (2005). Neuroscience: Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science*, 308(5726), 1314–1318. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1110647/SUPPL_FILE/1110647S9.MOV

- Nishida, F., Morel, G. R., Hereñú, C. B., Schwerdt, J. I., Goya, R. G., & Portiansky, E. L. (2011). Restorative effect of intracerebroventricular insulin-like growth factor-I gene therapy on motor performance in aging rats. *Neuroscience*, *177*, 195–206. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROSCIENCE.2011.01.013>
- Novoselova, E. G., Lunin, S. M., Glushkova, O. V., Khrenov, M. O., Parfenyuk, S. B., Zakharova, N. M., & Fesenko, E. E. (2018). Thymulin, free or bound to PBCA nanoparticles, protects mice against chronic septic inflammation. *PLOS ONE*, *13*(5), e0197601. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0197601>
- Numajiri, N., Takasawa, K., Nishiya, T., Tanaka, H., Ohno, K., Hayakawa, W., Asada, M., Matsuda, H., Azumi, K., Kamata, H., Nakamura, T., Hara, H., Minami, M., Lipton, S. A., & Uehara, T. (2011). On-off system for PI3-kinase-Akt signaling through S-nitrosylation of phosphatase with sequence homology to tensin (PTEN). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(25). <https://doi.org/10.1073/pnas.1103503108>
- Nyakas, C., Granic, I., Halmy, L. G., Banerjee, P., & Luiten, P. G. M. (2011). The basal forebrain cholinergic system in aging and dementia. Rescuing cholinergic neurons from neurotoxic amyloid- β 42 with memantine. *Behavioural Brain Research*, *221*(2), 594–603. <https://doi.org/10.1016/J.BBR.2010.05.033>
- O’Callaghan, J. P., Kelly, K. A., VanGilder, R. L., Sofroniew, M. V., & Miller, D. B. (2014). Early Activation of STAT3 Regulates Reactive Astroglia Induced by Diverse Forms of Neurotoxicity. *PLoS ONE*, *9*(7), 102003. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0102003>
- Oh, E. J., Lee, H. W., Kalimuthu, S., Kim, T. J., Kim, H. M., Baek, S. H., Zhu, L., Oh, J. M., Son, S. H., Chung, H. Y., & Ahn, B. C. (2018). In vivo migration of mesenchymal stem cells to burn injury sites and their therapeutic effects in a living mouse model. *Journal of Controlled Release*, *279*, 79–88. <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2018.04.020>
- Ohtaki, H., Ylostalo, J. H., Foraker, J. E., Robinson, A. P., Reger, R. L., Shioda, S., & Prockop, D. J. (2008). Stem/progenitor cells from bone marrow decrease neuronal death in global ischemia by modulation of inflammatory/immune responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(38), 14638. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0803670105>
- Okada, S., Nakamura, M., Katoh, H., Miyao, T., Shimazaki, T., Ishii, K., Yamane, J., Yoshimura, A., Iwamoto, Y., Toyama, Y., & Okano, H. (2006). Conditional ablation of Stat3 or Socs3 discloses a dual role for reactive astrocytes after spinal cord injury. *Nature Medicine* *2006* *12*:7, *12*(7), 829–834. <https://doi.org/10.1038/nm1425>
- Okano, T., Xuan, S., & Kelley, M. W. (2011). Insulin-Like Growth Factor Signaling Regulates the Timing of Sensory Cell Differentiation in the Mouse Cochlea. *Journal of Neuroscience*, *31*(49), 18104–18118. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3619-11.2011>
- O’Keefe, J., & Conway, D. H. (1978). Hippocampal place units in the freely moving rat: Why they fire where they fire. *Experimental Brain Research*, *31*(4), 573–590. <https://doi.org/10.1007/BF00239813/METRICS>
- O’Keefe, J., & Dostrovsky, J. (1971). The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Research*, *34*(1), 171–175. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(71\)90358-1](https://doi.org/10.1016/0006-8993(71)90358-1)
- Olmos-Alonso, A., Schetters, S. T. T., Sri, S., Askew, K., Mancuso, R., Vargas-Caballero, M., Holscher, C., Perry, V. H., & Gomez-Nicola, D. (2016). Pharmacological targeting of CSF1R inhibits microglial proliferation and prevents the progression of Alzheimer’s-like pathology. *Brain*, *139*(3). <https://doi.org/10.1093/brain/awv379>
- Olsen, M. L., & Sontheimer, H. (2008a). Functional implications for Kir4.1 channels in glial biology: From K⁺ buffering to cell differentiation. In *Journal of Neurochemistry* (Vol. 107, Issue 3, pp. 589–601). <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05615.x>

- Olsen, M. L., & Sontheimer, H. (2008b). Functional implications for Kir4.1 channels in glial biology: From K⁺ buffering to cell differentiation. In *Journal of Neurochemistry* (Vol. 107, Issue 3, pp. 589–601). <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05615.x>
- Osada, T., Yang, X. Y., Hartman, Z. C., Glass, O., Hodges, B. L., Niedzwiecki, D., Morse, M. A., Lyerly, H. K., Amalfitano, A., & Clay, T. M. (2009). Optimization of vaccine responses with an E1, E2b and E3-deleted Ad5 vector circumvents pre-existing anti-vector immunity. *Cancer Gene Therapy*, *16*(9), 673–682. <https://doi.org/10.1038/CGT.2009.17>
- Osmanovic Barilar, J., Knezovic, A., Grünblatt, E., Riederer, P., & Salkovic-Petrisic, M. (2015). 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). <https://doi.org/10.1212/wnl.53.9.1937>
- Özdinler, P. H., & Macklis, J. D. (2006). IGF-I specifically enhances axon outgrowth of corticospinal motor neurons. *Nature Neuroscience*, *9*(11), 1371–1381. <https://doi.org/10.1038/NN1789>
- Paidi, R., Nthenge-Ngumbau, D., Singh, R., Kankanala, T., Mehta, H., & Mohanakumar, K. (2015). Mitochondrial Deficits Accompany Cognitive Decline Following Single Bilateral Intracerebroventricular Streptozotocin. *Current Alzheimer Research*, *12*(8), 785–795. <https://doi.org/10.2174/1567205012666150710112618>
- Pajarillo, E., Rizor, A., Lee, J., Aschner, M., & Lee, E. (2019). The role of astrocytic glutamate transporters GLT-1 and GLAST in neurological disorders: potential targets for neurotherapeutics. *Neuropharmacology*, *161*, 107559. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROPHARM.2019.03.002>
- Pan, W., & Kastin, A. J. (2000). Interactions of IGF-1 with the blood-brain barrier in vivo and in situ. *Neuroendocrinology*, *72*(3), 171–178. <https://doi.org/10.1159/000054584>
- Panatier, A., Theodosis, D. T., Mothet, J. P., Touquet, B., Pollegioni, L., Poulain, D. A., & Oliet, S. H. R. (2006). Glia-Derived d-Serine Controls NMDA Receptor Activity and Synaptic Memory. *Cell*, *125*(4), 775–784. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.051>
- Pandini, G., Frasca, F., Mineo, R., Sciacca, L., Vigneri, R., & Belfiore, A. (2002). Insulin/insulin-like growth factor I hybrid receptors have different biological characteristics depending on the insulin receptor isoform involved. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(42). <https://doi.org/10.1074/jbc.M202766200>
- Paolicelli, R. C., Bolasco, G., Pagani, F., Maggi, L., Scianni, M., Panzanelli, P., Giustetto, M., Ferreira, T. A., Guiducci, E., Dumas, L., Ragozzino, D., & Gross, C. T. (2011). Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science*, *333*(6048), 1456–1458. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1202529/SUPPL_FILE/PAOLICELLI.SOM.PDF
- Paolicelli, R. C., Sierra, A., Stevens, B., Tremblay, M. E., Aguzzi, A., Ajami, B., Amit, I., Audinat, E., Bechmann, I., Bennett, M., Bennett, F., Bessis, A., Biber, K., Bilbo, S., Blurton-Jones, M., Boddeke, E., Brites, D., Brône, B., Brown, G. C., ... Wyss-Coray, T. (2022). Microglia states and nomenclature: A field at its crossroads. In *Neuron* (Vol. 110, Issue 21, pp. 3458–3483). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2022.10.020>
- Pardo, J., Abba, M. C., Lacunza, E., Ogunde, O. M., Paiva, I., Morel, G. R., Outeiro, T. F., & Goya, R. G. (2018). IGF-I Gene Therapy in Aging Rats Modulates Hippocampal Genes Relevant to Memory Function. *The Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences*, *73*(4), 459–467. <https://doi.org/10.1093/GERONA/GLX125>
- Pardo, J., Uriarte, M., Cónsole, G. M., Reggiani, P. C., Outeiro, T. F., Morel, G. R., & Goya, R. G. (2016). Insulin-like growth factor-I gene therapy increases hippocampal neurogenesis, astrocyte branching and improves spatial memory in female aging rats. *The European Journal of Neuroscience*, *44*(4), 2120–2128. <https://doi.org/10.1111/EJN.13278>

- Pardridge, W. M. (2011). Drug transport in brain via the cerebrospinal fluid. In *Fluids and Barriers of the CNS* (Vol. 8, Issue 1). <https://doi.org/10.1186/2045-8118-8-7>
- Pathan, A. R., Viswanad, B., Sonkusare, S. K., & Ramarao, P. (2006). Chronic administration of pioglitazone attenuates intracerebroventricular streptozotocin induced-memory impairment in rats. *Life Sciences*, *79*(23), 2209–2216. <https://doi.org/10.1016/J.LFS.2006.07.018>
- Patil, S. D., Rhodes, D. G., & Burgess, D. J. (2005). DNA-based therapeutics and DNA delivery systems: A comprehensive review. *The AAPS Journal*, *7*(1), E61. <https://doi.org/10.1208/AAPSJ070109>
- Paxinos, G., & Watson, C. (2007). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, Sixth Edition by George Paxinos and Charles Watson*.
- Pendlebury, S. T., & Rothwell, P. M. (2009). Prevalence, incidence, and factors associated with pre-stroke and post-stroke dementia: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Neurology*, *8*(11), 1006–1018. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(09\)70236-4](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(09)70236-4)
- Petridis, A. K., El Maarouf, A., & Rutishauser, U. (2004). Polysialic acid regulates cell contact-dependent neuronal differentiation of progenitor cells from the subventricular zone. *Developmental Dynamics*, *230*(4). <https://doi.org/10.1002/dvdy.20094>
- Phung, T. K. T., Waltoft, B. L., Laursen, T. M., Settnes, A., Kessing, L. V., Mortensen, P. B., & Waldemar, G. (2010). Hysterectomy, oophorectomy and risk of dementia: a nationwide historical cohort study. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*, *30*(1), 43–50. <https://doi.org/10.1159/000314681>
- Pike, C. J. (2017). Sex and the development of Alzheimer’s disease. *Journal of Neuroscience Research*, *95*(1–2), 671. <https://doi.org/10.1002/JNR.23827>
- Pike, C. J., Cummings, B. J., & Cotman, C. W. (1995). Early association of reactive astrocytes with senile plaques in Alzheimer’s disease. *Experimental Neurology*, *132*(2), 172–179. [https://doi.org/10.1016/0014-4886\(95\)90022-5](https://doi.org/10.1016/0014-4886(95)90022-5)
- Pilly, P. K., & Grossberg, S. (2012). How do spatial learning and memory occur in the brain? Coordinated learning of entorhinal grid cells and hippocampal place cells. *Journal of Cognitive Neuroscience*, *24*(5). https://doi.org/10.1162/jocn_a_00200
- Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., Moorman, M. A., Simonetti, D. W., Craig, S., & Marshak, D. R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science (New York, N.Y.)*, *284*(5411), 143–147. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.284.5411.143>
- Plaschke, K., & Hoyer, S. (1993). Action of the diabetogenic drug streptozotocin on glycolytic and glycogenolytic metabolism in adult rat brain cortex and hippocampus. *International Journal of Developmental Neuroscience: The Official Journal of the International Society for Developmental Neuroscience*, *11*(4), 477–483. [https://doi.org/10.1016/0736-5748\(93\)90021-5](https://doi.org/10.1016/0736-5748(93)90021-5)
- Pleau, J. M., Dardenne, M., Blouquit, Y., & Bach, J. F. (1977). Structural study of circulating thymic factor: a peptide isolated from pig serum. II. Amino acid sequence. *The Journal of Biological Chemistry*, *252*(22), 8045–8047.
- Poling, A., Cleary, J., & Monaghan, M. (1981). *BURYING BY RATS IN RESPONSE TO AVERSIVE AND NONAVERSIVE STIMULI*.
- Possel, H., Noack, H., Putzke, J., Wolf, G., & Sies, H. (2000). Selective upregulation of inducible nitric oxide synthase (iNOS) by lipopolysaccharide (LPS) and cytokines in microglia: In vitro and in vivo studies. *Glia*, *32*(1), 51–59. [https://doi.org/10.1002/1098-1136\(200010\)32:1<51::AID-GLIA50>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/1098-1136(200010)32:1<51::AID-GLIA50>3.0.CO;2-4)
- Precious B, & Russell WC. (1985). Growth, purification and titration of adenoviruses. In B. Mahy (Ed.), *Virology: a practical approach* (pp. 193–205).
- Puig, K. L., Kulas, J. A., Franklin, W., Rakoczy, S. G., Tagliablatella, G., Brown-Borg, H. M., & Combs, C. K. (2016). The Ames dwarf mutation attenuates Alzheimer’s disease phenotype of APP/PS1 mice. *Neurobiology of Aging*, *40*. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2015.12.021>

- Qu, Z. qiang, Zhou, Y., Zeng, Y. shan, Lin, Y. kun, Li, Y., Zhong, Z. qiang, & Chan, W. Y. (2012). Protective Effects of a Rhodiola Crenulata Extract and Salidroside on Hippocampal Neurogenesis against Streptozotocin-Induced Neural Injury in the Rat. *PLoS ONE*, 7(1), 29641. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0029641>
- Quintanilla, M. E., Ezquer, F., Morales, P., Santapau, D., Berríos-Cárcamo, P., Ezquer, M., Herrera-Marschitz, M., & Israel, Y. (2019). Intranasal mesenchymal stem cell secretome administration markedly inhibits alcohol and nicotine self-administration and blocks relapse-intake: Mechanism and translational options. *Stem Cell Research and Therapy*, 10(1). <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1304-z>
- Raina, P., Santaguida, P., Ismaila, A., Patterson, C., Cowan, D., Levine, M., Booker, L., & Oremus, M. (2008). Effectiveness of cholinesterase inhibitors and memantine for treating dementia: Evidence review for a clinical practice guideline. *Annals of Internal Medicine*, 148(5), 379–397. https://doi.org/10.7326/0003-4819-148-5-200803040-00009/SUPPL_FILE/RAINA_AT3_148-5-379-DC1-3.PDF
- Rajasekar, N., Nath, C., Hanif, K., & Shukla, R. (2017). Intranasal Insulin Administration Ameliorates Streptozotocin (ICV)-Induced Insulin Receptor Dysfunction, Neuroinflammation, Amyloidogenesis, and Memory Impairment in Rats. *Molecular Neurobiology*, 54(8), 6507–6522. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-0169-8>
- Rajendran, L., & Paolicelli, R. C. (2018). Microglia-mediated synapse loss in Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience*, 38(12), 2911–2919. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1136-17.2017>
- Rajkowska, G., Hughes, J., Stockmeier, C. A., Javier Miguel-Hidalgo, J., & Maciag, D. (2013). Coverage of blood vessels by astrocytic endfeet is reduced in major depressive disorder. *Biological Psychiatry*, 73(7), 613–621. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2012.09.024>
- Ranganath, C., & Ritchey, M. (2012). Two cortical systems for memory-guided behaviour. In *Nature Reviews Neuroscience* (Vol. 13, Issue 10, pp. 713–726). <https://doi.org/10.1038/nrn3338>
- Ransohoff, R. M., & Perry, V. H. (2009). Microglial Physiology: Unique Stimuli, Specialized Responses. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132528>, 27, 119–145.
- Raslau, F. D., Mark, I. T., Klein, A. P., Ulmer, J. L., Mathews, V., & Mark, L. P. (2015). Memory Part 2: The Role of the Medial Temporal Lobe. *AJNR: American Journal of Neuroradiology*, 36(5), 846. <https://doi.org/10.3174/AJNR.A4169>
- Ravona-Springer, R., Moshier, E., Schmeidler, J., Godbold, J., Akrivos, J., Rapp, M., Grossman, H. T., Wysocki, M., Silverman, J. M., Haroutunian, V., & Beeri, M. S. (2012). Changes in glycemic control are associated with changes in cognition in non-diabetic elderly. *Journal of Alzheimer's Disease*, 30(2). <https://doi.org/10.3233/JAD-2012-120106>
- Razmara, A., Duckles, S. P., Krause, D. N., & Procaccio, V. (2007). Estrogen Suppresses Brain Mitochondrial Oxidative Stress in Female and Male Rats. *Brain Research*, 1176(1), 71. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRES.2007.08.036>
- Reggiani, P. C., Hereñú, C. B., Rimoldi, O. J., Brown, O. A., Pléau, J. M., Dardenne, M., & Goya, R. G. (2006). Gene therapy for long-term restoration of circulating thymulin in thymectomized mice and rats. *Gene Therapy* 2006 13:16, 13(16), 1214–1221. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3302775>
- Rettberg, J. R., Yao, J., & Brinton, R. D. (2014). Estrogen: A master regulator of bioenergetic systems in the brain and body. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 35(1), 8. <https://doi.org/10.1016/J.YFRNE.2013.08.001>
- Richardson, C. A., & Flecknell, P. A. (2005). Anaesthesia and Post-operative Analgesia following Experimental Surgery in Laboratory Rodents: Are we Making Progress? <https://doi.org/10.1177/026119290503300207>, 33(2), 119–127. <https://doi.org/10.1177/026119290503300207>

- Rocca, W. A., Bower, J. H., Maraganore, D. M., Ahlskog, J. E., Grossardt, B. R., De Andrade, M., & Melton, L. J. (2007). Increased risk of cognitive impairment or dementia in women who underwent oophorectomy before menopause. *Neurology*, *69*(11), 1074–1083. <https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000276984.19542.E6>
- Röckle, I., Seidenfaden, R., Weinhold, B., Mühlenhoff, M., Gerardy-Schahn, R., & Hildebrandt, H. (2008). Polysialic acid controls NCAM-induced differentiation of neuronal precursors into calretinin-positive olfactory bulb interneurons. *Developmental Neurobiology*, *68*(9). <https://doi.org/10.1002/dneu.20649>
- Roger, C., Lasbleiz, A., Guye, M., Dutour, A., Gaborit, B., & Ranjeva, J. P. (2022). The Role of the Human Hypothalamus in Food Intake Networks: An MRI Perspective. In *Frontiers in Nutrition* (Vol. 8). <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.760914>
- Rönnemaa, E., Zethelius, B., Sundelöf, J., Sundström, J., Degerman-Gunnarsson, M., Berne, C., Lannfelt, L., & Kilander, L. (2008). Impaired insulin secretion increases the risk of Alzheimer disease. *Neurology*, *71*(14), 1065–1071. <https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000310646.32212.3A>
- Rosas-Ballina, M., & Tracey, K. J. (2009). Cholinergic control of inflammation. *Journal of Internal Medicine*, *265*(6), 663. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2796.2009.02098.X>
- 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>
- Rothstein, J. D., Martin, L., Levey, A. I., Dykes-Hoberg, M., Jin, L., Wu, D., Nash, N., & Kuncl, R. W. (1994). Localization of Neuronal and Glial Glutamate Transporters. In *Neuron* (Vol. 13).
- Safieh-Garabedian, B., Dardenne, M., Pléau, J. M., & Saadé, N. E. (2002). Potent analgesic and anti-inflammatory actions of a novel thymulin-related peptide in the rat. *British Journal of Pharmacology*, *136*(6), 947. <https://doi.org/10.1038/SJ.BJP.0704793>
- Safieh-Garabedian, B., Jabbur, S. J., Dardenne, M., & Saadé, N. E. (2011). Thymulin related peptide attenuates inflammation in the brain induced by intracerebroventricular endotoxin injection. *Neuropharmacology*, *60*(2–3), 496–504. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROPHARM.2010.11.004>
- Safieh-Garabedian, B., Ochoa-Chaar, C. I., Poole, S., Massaad, C. A., Atweh, S. F., Jabbur, S. J., & Saadé, N. E. (2003). Thymulin reverses inflammatory hyperalgesia and modulates the increased concentration of proinflammatory cytokines induced by i.c.v. endotoxin injection. *Neuroscience*, *121*(4), 865–873. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(03\)00500-1](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(03)00500-1)
- Safieh-Garabedian, B., Oz, M., Bey, R. M., Shamaa, F., Ashoor, A., El-Agnaf, O. M., & Saadé, N. E. (2013). Involvement of the $\alpha 7$ -nicotinic acetylcholine receptors in the anti-inflammatory action of the thymulin-related peptide (PAT). *Neuroscience*, *250*, 455–466. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROSCIENCE.2013.07.031>
- Sagar, H. J., Cohen, N. J., Sullivan, E. V., Corkin, S., & Growdon, J. H. (1988). Remote memory function in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Brain: A Journal of Neurology*, *111* (Pt 1)(1), 185–206. <https://doi.org/10.1093/BRAIN/111.1.185>
- Salkovic-Petrisic, M., & Hoyer, S. (2007). Central insulin resistance as a trigger for sporadic Alzheimer-like pathology: an experimental approach. In *J Neural Transm*. Springer-Verlag. www.molgen.com
- Salkovic-Petrisic, M., Osmanovic-Barilar, J., Brückner, M. K., Hoyer, S., Arendt, T., & Riederer, P. (2011). Cerebral amyloid angiopathy in streptozotocin rat model of sporadic Alzheimer's disease: a long-term follow up study. *Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria: 1996)*, *118*(5), 765–772. <https://doi.org/10.1007/S00702-011-0651-4>
- Salkovic-Petrisic, M., Tribl, F., Schmidt, M., Hoyer, S., & Riederer, P. (2006). Alzheimer-like changes in protein kinase B and glycogen synthase kinase-3 in rat frontal cortex and hippocampus after damage

- to the insulin signalling pathway. *Journal of Neurochemistry*, 96(4), 1005–1015. <https://doi.org/10.1111/J.1471-4159.2005.03637.X>
- Sandberg, A. C., Engberg, C., Lake, M., von Holst, H., & Sara, V. R. (1988). The expression of insulin-like growth factor I and insulin-like growth factor II genes in the human fetal and adult brain and in glioma. *Neuroscience Letters*, 93(1), 114–119. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(88\)90022-5](https://doi.org/10.1016/0304-3940(88)90022-5)
- Sang Jo, Y., Eun, H. P., Il, H. K., Soon, K. P., Kim, H., Hyun, T. K., & Choi, J. S. (2007). The Medial Prefrontal Cortex Is Involved in Spatial Memory Retrieval under Partial-Cue Conditions. *Journal of Neuroscience*, 27(49), 13567–13578. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3589-07.2007>
- Santo, E. E., Stroeken, P., Sluis, P. V., Koster, J., Versteeg, R., & Westerhout, E. M. (2013). FOXO3a Is a Major Target of Inactivation by PI3K/AKT Signaling in Aggressive Neuroblastoma. *Cancer Research*, 73(7), 2189–2198. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-3767>
- Santos, T. de O., Mazucanti, C. H. Y., Xavier, G. F., & da Silva Torráo, A. (2012). Early and late neurodegeneration and memory disruption after intracerebroventricular streptozotocin. *Physiology & Behavior*, 107(3), 401–413. <https://doi.org/10.1016/J.PHYSBEH.2012.06.019>
- Santos-Galindo, M., Acaz-Fonseca, E., Bellini, M. J., & Garcia-Segura, L. M. (2011). Sex differences in the inflammatory response of primary astrocytes to lipopolysaccharide. *Biology of Sex Differences*, 2(1). <https://doi.org/10.1186/2042-6410-2-7>
- Saré, R. M., Lemons, A., & Smith, C. B. (2021). Behavior testing in rodents: Highlighting potential confounds affecting variability and reproducibility. In *Brain Sciences* (Vol. 11, Issue 4). <https://doi.org/10.3390/brainsci11040522>
- Sarugaser, R., Lickorish, D., Baksh, D., Hosseini, M. M., Davies, J. E., & Davies, J. E. (2005). Human Umbilical Cord Perivascular (HUCPV) Cells: A Source of Mesenchymal Progenitors. *Stem Cells*, 23(2), 220–229. <https://doi.org/10.1634/STEMCELLS.2004-0166>
- Sarvari, M., Hrabovszky, E., Kallo, I., Solymosi, N., Liko, I., Berchtold, N., Cotman, C., & Liposits, Z. (2012). Menopause leads to elevated expression of macrophage-associated genes in the aging frontal cortex: rat and human studies identify strikingly similar changes. *Journal of Neuroinflammation*, 9, 264–264. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-9-264>
- Sárvári, M., Kalló, I., Hrabovszky, E., Solymosi, N., & Liposits, Z. (2014). Ovariectomy and Subsequent Treatment with Estrogen Receptor Agonists Tune the Innate Immune System of the Hippocampus in Middle-Aged Female Rats. *PLOS ONE*, 9(2), e88540. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0088540>
- Savino, W., & Dardenne, M. (2000). Neuroendocrine control of thymus physiology. *Endocrine Reviews*, 21(4), 412–443. <https://doi.org/10.1210/EDRV.21.4.0402>
- Schafer, D. P., Lehrman, E. K., Kautzman, A. G., Koyama, R., Mardinly, A. R., Yamasaki, R., Ransohoff, R. M., Greenberg, M. E., Barres, B. A., & Stevens, B. (2012). Microglia Sculpt Postnatal Neural Circuits in an Activity and Complement-Dependent Manner. *Neuron*, 74(4), 691. <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2012.03.026>
- Schaffer, D. V., Koerber, J. T., & Lim, K. II. (2008). Molecular Engineering of Viral Gene Delivery Vehicles. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 10, 169. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.BIOENG.10.061807.160514>
- Scheff, S. W., & Price, D. A. (2006). Alzheimer's disease-related alterations in synaptic density: Neocortex and hippocampus. In *Journal of Alzheimer's Disease* (Vol. 9). IOS Press.
- Scheuner, D., Eckman, C., Jensen, M., Song, X., Citron, M., Suzuki, N., Bird, T. D., Hardy, J., Hutton, M., Kukull, W., Larson, E., Levy-Lahad, E., Viitanen, M., Peskind, E., Poorkaj, P., Schellenberg, G., Tanzi, R., Wasco, W., Lannfelt, L., ... Younkin, S. (1996). Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nature Medicine*, 2(8), 864–870. <https://doi.org/10.1038/NM0896-864>

- Schliebs, R., & Arendt, T. (2006). The significance of the cholinergic system in the brain during aging and in Alzheimer's disease. In *Journal of Neural Transmission* (Vol. 113, Issue 11, pp. 1625–1644). <https://doi.org/10.1007/s00702-006-0579-2>
- Schmidt, P. J., Ben Dor, R., Martinez, P. E., Guerrieri, G. M., Harsh, V. L., Thompson, K., Koziol, D. E., Nieman, L. K., & Rubinow, D. R. (2015). Effects of estradiol withdrawal on mood in women with past perimenopausal depression: A randomized clinical trial. *JAMA Psychiatry*, 72(7). <https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2015.0111>
- Schmitt, D., Monier, J. C., Dardenne, M., Pleau, J. M., Deschaux, P., & Bach, J. F. (1980). Cytoplasmic localization of FTS (facteur thymique sérique) in thymic epithelial cells. An immunoelectronmicroscopical study. *Thymus*, 2(3), 177–186.
- Schneider, A., Biernat, J., Von Bergen, M., Mandelkow, E., & Mandelkow, E. M. (1999). Phosphorylation that detaches tau protein from microtubules (Ser262, Ser214) also protects it against aggregation into Alzheimer paired helical filaments. *Biochemistry*, 38(12), 3549–3558. <https://doi.org/10.1021/BI981874P>
- Schneider, T., & Popik, P. (2007). Attenuation of estrous cycle-dependent marble burying in female rats by acute treatment with progesterone and antidepressants. *Psychoneuroendocrinology*, 32(6), 651–659. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2007.04.003>
- Seimetz, D., Heller, K., & Richter, J. (2019). Approval of First CAR-Ts: Have we Solved all Hurdles for ATMPs? *Cell Medicine*, 11, 215517901882278. <https://doi.org/10.1177/2155179018822781>
- Seki, T., & Rutishauser, U. (1998). Removal of polysialic acid-neural cell adhesion molecule induces aberrant mossy fiber innervation and ectopic synaptogenesis in the hippocampus. *Journal of Neuroscience*, 18(10). <https://doi.org/10.1523/jneurosci.18-10-03757.1998>
- Selles, M. C., Fortuna, J. T. S., Zappa-Villar, M. F., de Faria, Y. P. R., Souza, A. S., Suemoto, C. K., Leite, R. E. P., Rodriguez, R. D., Grinberg, L. T., Reggiani, P. C., & Ferreira, S. T. (2020). Adenovirus-Mediated Transduction of Insulin-Like Growth Factor 1 Protects Hippocampal Neurons from the Toxicity of Aβ Oligomers and Prevents Memory Loss in an Alzheimer Mouse Model. *Molecular Neurobiology*, 57(3), 1473–1483. <https://doi.org/10.1007/s12035-019-01827-y>
- Sengupta, A., Kabat, J., Novak, M., Wu, Q., Grundke-Iqbal, I., & Iqbal, K. (1998). Phosphorylation of tau at both Thr 231 and Ser 262 is required for maximal inhibition of its binding to microtubules. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 357(2), 299–309. <https://doi.org/10.1006/ABBI.1998.0813>
- Serrano-Pozo, A., Frosch, M. P., Masliah, E., & Hyman, B. T. (2011). Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 1(1). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006189>
- Serrano-Pozo, A., Gómez-Isla, T., Growdon, J. H., Frosch, M. P., & Hyman, B. T. (2013). A Phenotypic Change But Not Proliferation Underlies Glial Responses in Alzheimer Disease. *The American Journal of Pathology*, 182(6), 2332. <https://doi.org/10.1016/J.AJP.2013.02.031>
- Shansky, R. M., & Murphy, A. Z. (2021). Considering sex as a biological variable will require a global shift in science culture. In *Nature Neuroscience* (Vol. 24, Issue 4, pp. 457–464). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41593-021-00806-8>
- Sheng, W., Zong, Y., Mohammad, A., Ajit, D., Cui, J., Han, D., Hamilton, J. L., Simonyi, A., Sun, A. Y., Gu, Z., Hong, J. S., Weisman, G. A., & Sun, G. Y. (2011). Pro-inflammatory cytokines and lipopolysaccharide induce changes in cell morphology, and upregulation of ERK1/2, iNOS and sPLA2-IIA expression in astrocytes and microglia. *Journal of Neuroinflammation*, 8. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-8-121>
- Sherrington, R., Rogaev, E. I., Liang, Y., Rogaeva, E. A., Levesque, G., Ikeda, M., Chi, H., Lin, C., Li, G., Holman, K., Tsuda, T., Mar, L., Foncin, J. F., Bruni, A. C., Montesi, M. P., Sorbi, S., Rainero, I., Pinessi, L., Nee, L., ... St George-Hyslop, P. H. (1995). Cloning of a gene bearing missense mutations in early-

- onset familial Alzheimer's disease. *Nature* 1995 375:6534, 375(6534), 754–760. <https://doi.org/10.1038/375754a0>
- Shoham, S., Bejar, C., Kovalev, E., Schorer-Apelbaum, D., & Weinstock, M. (2007). Ladostigil prevents gliosis, oxidative-nitrative stress and memory deficits induced by intracerebroventricular injection of streptozotocin in rats. *Neuropharmacology*, 52(3), 836–843. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROPHARM.2006.10.005>
- Shoham, S., Bejar, C., Kovalev, E., & Weinstock, M. (2003). Intracerebroventricular injection of streptozotocin causes neurotoxicity to myelin that contributes to spatial memory deficits in rats. *Experimental Neurology*, 184(2), 1043–1052. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2003.08.015>
- Simpson, J. E., Ince, P. G., Lace, G., Forster, G., Shaw, P. J., Matthews, F., Savva, G., Brayne, C., & Wharton, S. B. (2010). Astrocyte phenotype in relation to Alzheimer-type pathology in the ageing brain. *Neurobiology of Aging*, 31(4), 578–590. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROBIOLAGING.2008.05.015>
- Singh, M., & Su, C. (2013). Progesterone and Neuroprotection. *Hormones and Behavior*, 63(2), 284. <https://doi.org/10.1016/J.YHBEH.2012.06.003>
- Sirko, S., Behrendt, G., Johansson, P. A., Tripathi, P., Costa, M., Bek, S., Heinrich, C., Tiedt, S., Colak, D., Dichgans, M., Fischer, I. R., Plesnila, N., Staufenbiel, M., Haass, C., Snapyan, M., Saghatelian, A., Tsai, L. H., Fischer, A., Grobe, K., ... Götz, M. (2013). Reactive glia in the injured brain acquire stem cell properties in response to sonic hedgehog glia. *Cell Stem Cell*, 12(4), 426–439. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2013.01.019>
- Slattery, D. A., Neumann, I. D., & Cryan, J. F. (2011). Transient inactivation of the infralimbic cortex induces antidepressant-like effects in the rat. *Journal of Psychopharmacology*, 25(10). <https://doi.org/10.1177/0269881110368873>
- Small, S. A., & Duff, K. (2008). Linking Abeta and tau in late-onset Alzheimer's disease: a dual pathway hypothesis. *Neuron*, 60(4), 534–542. <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2008.11.007>
- Sofroniew, M. V., & Vinters, H. V. (2010). Astrocytes: Biology and pathology. In *Acta Neuropathologica* (Vol. 119, Issue 1, pp. 7–35). <https://doi.org/10.1007/s00401-009-0619-8>
- Sohrabi, M., Floden, A. M., Manocha, G. D., Klug, M. G., & Combs, C. K. (2020). IGF-1R Inhibitor Ameliorates Neuroinflammation in an Alzheimer's Disease Transgenic Mouse Model. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 14. <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.00200>
- Sorge, R. E., Martin, L. J., Isbester, K. A., Sotocinal, S. G., Rosen, S., Tuttle, A. H., Wieskopf, J. S., Acland, E. L., Dokova, A., Kadoura, B., Leger, P., Mapplebeck, J. C. S., McPhail, M., Delaney, A., Wigerblad, G., Schumann, A. P., Quinn, T., Frasnelli, J., Svensson, C. I., ... Mogil, J. S. (2014). Olfactory exposure to males, including men, causes stress and related analgesia in rodents. *Nature Methods* 2014 11:6, 11(6), 629–632. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2935>
- Sperber, B. R., Leight, S., Goedert, M., & Lee, V. M.-Y. (1995). Glycogen synthase kinase-3 β phosphorylates tau protein at multiple sites in intact cells. *Neuroscience Letters*, 197(2), 149–153. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(95\)11902-9](https://doi.org/10.1016/0304-3940(95)11902-9)
- 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>
- Steen, E., Terry, B. M., Rivera, E. J., Cannon, J. L., Neely, T. R., Tavares, R., Xu, X. J., Wands, J. R., & De La Monte, S. M. (2005). Impaired insulin and insulin-like growth factor expression and signaling mechanisms in Alzheimer's disease - Is this type 3 diabetes? *Journal of Alzheimer's Disease*, 7(1). <https://doi.org/10.3233/JAD-2005-7107>
- Stelzma, R. A., Norman Schnitzlein, H., & Murlagh, F. R. (1995). An English translation of Alzheimer's 1907 Paper, "ijber eine eigenartige Erlranliung der Hirnrinde." In *Clinical Anatomy* (Vol. 8).
- Stoub, T. R., DeToledo-Morrell, L., Stebbins, G. T., Leurgans, S., Bennett, D. A., & Shah, R. C. (2006). Hippocampal disconnection contributes to memory dysfunction in individuals at risk for Alzheimer's

- disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(26), 10041. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0603414103>
- Stranahan, A. M., Norman, E. D., Lee, K., Cutler, R. G., Telljohann, R. S., Egan, J. M., & Mattson, M. P. (2008). Diet-induced insulin resistance impairs hippocampal synaptic plasticity and cognition in middle-aged rats. *Hippocampus*, 18(11). <https://doi.org/10.1002/hipo.20470>
- Strang, K. H., Sorrentino, Z. A., Riffe, C. J., Gorion, K. M. M., Vijayaraghavan, N., Golde, T. E., & Giasson, B. I. (2019). Phosphorylation of serine 305 in tau inhibits aggregation. *Neuroscience Letters*, 692, 187–192. <https://doi.org/10.1016/J.NEULET.2018.11.011>
- Strittmatter, W. J., Saunders, A. M., Schmechel, D., Pericak-Vance, M., Enghild, J., Salvesen, G. S., & Roses, A. D. (1993). Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(5), 1977. <https://doi.org/10.1073/PNAS.90.5.1977>
- Su, D., Zhao, Y., Xu, H., Wang, B., Chen, X., Chen, J., & Wang, X. (2012). Isoflurane exposure during mid-adulthood attenuates age-related spatial memory impairment in APP/PS1 transgenic mice. *PLoS One*, 7(11). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0050172>
- Su, L., Hayes, L., Soteriades, S., Williams, G., Brain, S. A. E., Firbank, M. J., Longoni, G., Arnold, R. J., Rowe, J. B., & O'Brien, J. T. (2018). Hippocampal Stratum Radiatum, Lacunosum and Moleculare Sparing in Mild Cognitive Impairment. *Journal of Alzheimer's Disease: JAD*, 61(1), 415. <https://doi.org/10.3233/JAD-170344>
- Suzuki, Y., & Imayoshi, I. (2017). Network analysis of exploratory behaviors of mice in a spatial learning and memory task. *PLoS ONE*, 12(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180789>
- Swaab, D. F., Chung, W. C. J., Kruijver, F. P. M., Hofman, M. A., & Ishunina, T. A. (2001). Structural and functional sex differences in the human hypothalamus. *Hormones and Behavior*, 40(2). <https://doi.org/10.1006/hbeh.2001.1682>
- Swerdlow, R. H., & Khan, S. M. (2004). A “mitochondrial cascade hypothesis” for sporadic Alzheimer’s disease. *Medical Hypotheses*, 63(1), 8–20. <https://doi.org/10.1016/J.MEHY.2003.12.045>
- Szabó, C., Ischiropoulos, H., & Radi, R. (2007). Peroxynitrite: Biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. In *Nature Reviews Drug Discovery* (Vol. 6, Issue 8). <https://doi.org/10.1038/nrd2222>
- Szaruga, M., Veugelen, S., Benurwar, M., Lismont, S., Sepulveda-Falla, D., Lleo, A., Ryan, N. S., Lashley, T., Fox, N. C., Murayama, S., Gijzen, H., De Strooper, B., & Chávez-Gutiérrez, L. (2015). Qualitative changes in human γ -secretase underlie familial Alzheimer’s disease. *The Journal of Experimental Medicine*, 212(12), 2003. <https://doi.org/10.1084/JEM.20150892>
- Szkudelski, T. (2001). The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. In *Physiological Research* (Vol. 50, Issue 6).
- Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*, 126(4), 663–676. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>
- Talbot, K., Wang, H. Y., Kazi, H., Han, L. Y., Bakshi, K. P., Stucky, A., Fuino, R. L., Kawaguchi, K. R., Samoyedny, A. J., Wilson, R. S., Arvanitakis, Z., Schneider, J. A., Wolf, B. A., Bennett, D. A., Trojanowski, J. Q., & Arnold, S. E. (2012). Demonstrated brain insulin resistance in Alzheimer’s disease patients is associated with IGF-1 resistance, IRS-1 dysregulation, and cognitive decline. *Journal of Clinical Investigation*, 122(4). <https://doi.org/10.1172/JCI59903>
- Tan, Y. L., Yuan, Y., & Tian, L. (2020). Microglial regional heterogeneity and its role in the brain. In *Molecular Psychiatry* (Vol. 25, Issue 2). <https://doi.org/10.1038/s41380-019-0609-8>
- Tanaka, T., Kai, S., Matsuyama, T., Adachi, T., Fukuda, K., & Hirota, K. (2013). General Anesthetics Inhibit LPS-Induced IL-1 β Expression in Glial Cells. *PLOS ONE*, 8(12), e82930. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0082930>

- Tanaka, T., Ogata, A., Inomata, A., & Nakae, D. (2014). Effects of Different Types of Bedding Materials on Behavioral Development in Laboratory CD1 Mice (*Mus musculus*). *Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology*, *101*(5), 393–401. <https://doi.org/10.1002/BDRB.21129>
- Tang, X., Taniguchi, K., & Kofuji, P. (2009). HETEROGENEITY OF KIR4.1 CHANNEL EXPRESSION IN GLIA REVEALED BY MOUSE TRANSGENESIS. *Glia*, *57*(16), 1706. <https://doi.org/10.1002/GLIA.20882>
- Teixeira, F. G., Carvalho, M. M., Panchalingam, K. M., Rodrigues, A. J., Mendes-Pinheiro, B., Anjo, S., Manadas, B., Behie, L. A., Sousa, N., & Salgado, A. J. (2017). Impact of the Secretome of Human Mesenchymal Stem Cells on Brain Structure and Animal Behavior in a Rat Model of Parkinson's Disease. *Stem Cells Translational Medicine*, *6*(2), 634. <https://doi.org/10.5966/SCTM.2016-0071>
- Terry, R. D., Masliah, E., Salmon, D. P., Butters, N., Deteresa, R., Hill, R., Hansen, L. A., & Katzman, R. (1991). *Physical Basis of Cognitive Alterations in Alzheimer's Disease: Synapse Loss Is the Major Correlate of Cognitive Impairment*.
- Terry, A. V., & Buccafusco, J. J. (2003). The Cholinergic Hypothesis of Age and Alzheimer's Disease-Related Cognitive Deficits: Recent Challenges and Their Implications for Novel Drug Development. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *306*(3), 821–827. <https://doi.org/10.1124/JPET.102.041616>
- Thomson, J. A. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, *282*(5391). <https://doi.org/10.1126/science.282.5391.1145>
- Thorne, R. G., Pronk, G. J., Padmanabhan, V., & Frey, W. H. (2004). Delivery of insulin-like growth factor-I to the rat brain and spinal cord along olfactory and trigeminal pathways following intranasal administration. *Neuroscience*, *127*(2), 481–496. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.05.029>
- Timper, K., & Brüning, J. C. (2017). Hypothalamic circuits regulating appetite and energy homeostasis: Pathways to obesity. *DMM Disease Models and Mechanisms*, *10*(6). <https://doi.org/10.1242/dmm.026609>
- Tomko, R. P., Xu, R., & Philipson, L. (1997). HCAR and MCAR: The human and mouse cellular receptors for subgroup C adenoviruses and group B coxsackieviruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *94*(7), 3352. <https://doi.org/10.1073/PNAS.94.7.3352>
- Torres-Aleman, I., Pons, S., & Arévalo, M. A. (1994). The insulin-like growth factor I system in the rat cerebellum: Developmental regulation and role in neuronal survival and differentiation. *Journal of Neuroscience Research*, *39*(2), 117–126. <https://doi.org/10.1002/JNR.490390202>
- Trejo, J. L., Carro, E., & Torres-Alemán, I. (2001). Circulating Insulin-Like Growth Factor I Mediates Exercise-Induced Increases in the Number of New Neurons in the Adult Hippocampus. *The Journal of Neuroscience*, *21*(5), 1628. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-05-01628.2001>
- Tuscher, J. J., Taxier, L. R., Fortress, A. M., & Frick, K. M. (2018). Chemogenetic inactivation of the dorsal hippocampus and medial prefrontal cortex, individually and concurrently, impairs object recognition and spatial memory consolidation in female mice. *Neurobiology of Learning and Memory*, *156*. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2018.11.002>
- Uccelli, A., Moretta, L., & Pistoia, V. (2008). Mesenchymal stem cells in health and disease. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 8, Issue 9, pp. 726–736). <https://doi.org/10.1038/nri2395>
- Unger, J., McNeill, T. H., Moxley, R. T., White, M., Moss, A., & Livingston, J. N. (1989). Distribution of insulin receptor-like immunoreactivity in the rat forebrain. *Neuroscience*, *31*(1), 143–157. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(89\)90036-5](https://doi.org/10.1016/0306-4522(89)90036-5)
- Veerendra Kumar, M. H., & Gupta, Y. K. (2003). Effect of *Centella asiatica* on cognition and oxidative stress in an intracerebroventricular streptozotocin model of Alzheimer's disease in rats. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, *30*(5–6), 336–342. <https://doi.org/10.1046/J.1440-1681.2003.03842.X>

- Vehmas, A. K., Kawas, C. H., Stewart, W. F., & Troncoso, J. C. (2003). Immune reactive cells in senile plaques and cognitive decline in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 24(2), 321–331. [https://doi.org/10.1016/S0197-4580\(02\)00090-8](https://doi.org/10.1016/S0197-4580(02)00090-8)
- Visser, P. J., Verhey, F. R. J., Hofman, P. A. M., Scheltens, P., & Jolles, J. (2002). Medial temporal lobe atrophy predicts Alzheimer's disease in patients with minor cognitive impairment. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 72(4), 491–497. <https://doi.org/10.1136/JNRP.72.4.491>
- Vivian-Taylor, J., & Hickey, M. (2014). Menopause and depression: Is there a link? In *Maturitas* (Vol. 79, Issue 2). <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2014.05.014>
- Voronkov, D. N., Stavrovskaya, A. V., Stelmashook, E. V., Genrikhs, E. E., & Isaev, N. K. (2019). Neurodegenerative Changes in Rat Brain in Streptozotocin Model of Alzheimer's Disease. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 166(6), 793–796. <https://doi.org/10.1007/s10517-019-04442-y>
- Waldron, J., McCourty, A., & Lecanu, L. (2010). Aging differentially affects male and female neural stem cell neurogenic properties. *Stem Cells and Cloning: Advances and Applications*, 3(1), 119. <https://doi.org/10.2147/SCCAA.S13035>
- Walsh, D. M., Klyubin, I., Fadeeva, J. V., Cullen, W. K., Anwyl, R., Wolfe, M. S., Rowan, M. J., & Selkoe, D. J. (2002). Naturally secreted oligomers of amyloid β protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature* 2002 416:6880, 416(6880), 535–539. <https://doi.org/10.1038/416535a>
- Walsh, D. M., & Selkoe, D. J. (2007). A β Oligomers – a decade of discovery. *Journal of Neurochemistry*, 101(5), 1172–1184. <https://doi.org/10.1111/J.1471-4159.2006.04426.X>
- Walsh, D. M., Tseng, B. P., Rydel, R. E., Podlisny, M. B., & Selkoe, D. J. (2000). The Oligomerization of Amyloid β -Protein Begins Intracellularly in Cells Derived from Human Brain†. *Biochemistry*, 39(35), 10831–10839. <https://doi.org/10.1021/BI001048S>
- Walsh, R. N., & Cummins, R. A. (1976). *The Open-Field Test: a critical review - PubMed*. Psychological Bulletin. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17582919/>
- Walter, H. J., Berry, M., Hill, D. J., & Logan, A. (1997). Spatial and temporal changes in the insulin-like growth factor (IGF) axis indicate autocrine/paracrine actions of IGF-I within wounds of the rat brain. *Endocrinology*, 138(7). <https://doi.org/10.1210/endo.138.7.5284>
- Wang, H., Yu, M., Ochani, M., Amelia, C. A., Tanovic, M., Susarla, S., Li, J. H., Wang, H., Yang, N., Ulloa, L., Al-Abed, Y., Czura, C. J., & Tracey, K. J. (2002). Nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 7$ subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature* 2003 421:6921, 421(6921), 384–388. <https://doi.org/10.1038/nature01339>
- Wang, Y., Balaji, V., Kaniyappan, S., Krüger, L., Irsen, S., Tepper, K., Chandupatla, R., Maetzler, W., Schneider, A., Mandelkow, E., & Mandelkow, E. M. (2017). The release and trans-synaptic transmission of Tau via exosomes. *Molecular Neurodegeneration*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/S13024-016-0143-Y>
- Wang, Y., Ulland, T. K., Ulrich, J. D., Song, W., Tzaferis, J. A., Hole, J. T., Yuan, P., Mahan, T. E., Shi, Y., Gilfillan, S., Cella, M., Grutzendler, J., DeMattos, R. B., Cirrito, J. R., Holtzman, D. M., & Colonna, M. (2016). TREM2-mediated early microglial response limits diffusion and toxicity of amyloid plaques. *The Journal of Experimental Medicine*, 213(5), 667. <https://doi.org/10.1084/JEM.20151948>
- Webster, K. M., Wright, D. K., Sun, M., Semple, B. D., Ozturk, E., Stein, D. G., O'Brien, T. J., & Shultz, S. R. (2015). Progesterone treatment reduces neuroinflammation, oxidative stress and brain damage and improves long-term outcomes in a rat model of repeated mild traumatic brain injury. *Journal of Neuroinflammation*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/S12974-015-0457-7>
- Webster, S. J., Bachstetter, A. D., Nelson, P. T., Schmitt, F. A., & Van Eldik, L. J. (2014). Using mice to model Alzheimer's dementia: An overview of the clinical disease and the preclinical behavioral changes in 10 mouse models. *Frontiers in Genetics*, 5(APR). <https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00088>

- Wei, W., Lu, M., Lan, X. B., Liu, N., Su, W. K., Dushkin, A. V., & Yu, J. Q. (2021). Neuroprotective Effects of Oxymatrine on PI3K/Akt/mTOR Pathway After Hypoxic-Ischemic Brain Damage in Neonatal Rats. *Frontiers in Pharmacology*, *12*, 521. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2021.642415/BIBTEX>
- Weissman, M. M., Bland, R. C., Canino, G. J., Faravelli, C., Greenwald, S., Hwu, H. G., Joyce, P. R., Karam, E. G., Lee, C. K., Lellouch, J., Lépine, J. P., Newman, S. C., Rubio-Stipec, M., Wells, J. E., Wickramaratne, P. J., Wittchen, H., & Yeh, E. K. (1996). Cross-national epidemiology of major depression and bipolar disorder. *JAMA*, *276*(4), 293–299.
- Werling, D. M., & Geschwind, D. H. (2013). Sex differences in autism spectrum disorders. *Current Opinion in Neurology*, *26*(2), 146. <https://doi.org/10.1097/WCO.0B013E32835EE548>
- West, M. J., & Gundersen, H. J. G. (1990). Unbiased stereological estimation of the number of neurons in the human hippocampus. *Journal of Comparative Neurology*, *296*(1), 1–22. <https://doi.org/10.1002/CNE.902960102>
- Wharton, W., Gleason, C. E., Lorenze, K. R., Markgraf, T. S., Ries, M. L., Carlsson, C. M., & Asthana, S. (2009). Potential role of estrogen in the pathobiology and prevention of Alzheimer's disease. *American Journal of Translational Research*, *1*(2), 131. [/pmc/articles/PMC2776312/](https://doi.org/10.1155/2009/131)
- Whooley, M. A., Grady, D., & Cauley, J. A. (2000). Postmenopausal estrogen therapy and depressive symptoms in older women. *Journal of General Internal Medicine*, *15*(8). <https://doi.org/10.1046/j.1525-1497.2000.04029.x>
- Wiethoff, C. M., & Nemerow, G. R. (2015). Adenovirus Membrane Penetration: Tickling the Tail of a Sleeping Dragon. *Virology*, *0*, 591. <https://doi.org/10.1016/J.VIROL.2015.03.006>
- Wilcock, D. M., Vitek, M. P., & Colton, C. A. (2009). Vascular amyloid alters astrocytic water and potassium channels in mouse models and humans with Alzheimer's disease. *Neuroscience*, *159*(3). <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.01.023>
- Woolf, N. J. (1991). Cholinergic systems in mammalian brain and spinal cord. In *Progress in Neurobiology* (Vol. 37, Issue 6). [https://doi.org/10.1016/0301-0082\(91\)90006-M](https://doi.org/10.1016/0301-0082(91)90006-M)
- Woolley, C. S., Gould, E., Frankfurt, M., & McEwen, B. S. (1990). Naturally occurring fluctuation in dendritic spine density on adult hippocampal pyramidal neurons. *The Journal of Neuroscience*, *10*(12), 4035. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.10-12-04035.1990>
- Wooten, G. F., Currie, L. J., Bovbjerg, V. E., Lee, J. K., & Patrie, J. (2004). Are men at greater risk for Parkinson's disease than women? *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, *75*(4), 637–639. <https://doi.org/10.1136/JNNP.2003.020982>
- Wu, C., Yang, L., Tucker, D., Dong, Y., Zhu, L., Duan, R., Liu, T. C. Y., & Zhang, Q. (2018). Beneficial Effects of Exercise Pretreatment in a Sporadic Alzheimer's Rat Model. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, *50*(5), 945. <https://doi.org/10.1249/MSS.0000000000001519>
- Xu, Z. P., Gan, G. S., Liu, Y. M., Xiao, J. S., Liu, H. X., Mei, B., & Zhang, J. J. (2018). Adiponectin Attenuates Streptozotocin-Induced Tau Hyperphosphorylation and Cognitive Deficits by Rescuing PI3K/Akt/GSK-3 β Pathway. *Neurochemical Research*, *43*(2). <https://doi.org/10.1007/s11064-017-2426-2>
- Yadollahkhales, G., & Rojas, J. C. (2023). Anti-Amyloid Immunotherapies for Alzheimer's Disease: A 2023 Clinical Update. *Neurotherapeutics*. <https://doi.org/10.1007/s13311-023-01405-0>
- Yaffe, K., Blackwell, T., Kanaya, A. M., Davidowitz, N., Barrett-Connor, E., & Krueger, K. (2004). Diabetes, impaired fasting glucose, and development of cognitive impairment in older women. *Neurology*, *63*(4). <https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000134666.64593.BA>
- Yamada, T., Kawamata, T., Walker, D. G., & McGeer, P. L. (1992). Vimentin immunoreactivity in normal and pathological human brain tissue. *Acta Neuropathologica*, *84*(2), 157–162. <https://doi.org/10.1007/BF00311389>
- Yamaguchi, A., Tamatani, M., Matsuzaki, H., Namikawa, K., Kiyama, H., Vitek, M. P., Mitsuda, N., & Tohyama, M. (2001). Akt Activation Protects Hippocampal Neurons from Apoptosis by Inhibiting

- Transcriptional Activity of p53. *Journal of Biological Chemistry*, 276(7), 5256–5264. <https://doi.org/10.1074/jbc.M008552200>
- Yamamoto, H., Sohmiya, M., Oka, N., & Kato, Y. (1991). Effects of aging and sex on plasma insulin-like growth factor I (IGF-I) levels in normal adults. *Acta Endocrinologica*, 124(5), 497–500. <https://doi.org/10.1530/ACTA.0.1240497>
- Yan, S., Fu, W., Wang, C., Mao, J., Liu, B., Zou, L., & Lv, C. (2020). Association between sedentary behavior and the risk of dementia: a systematic review and meta-analysis. *Translational Psychiatry*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/S41398-020-0799-5>
- Yang, W., Ma, J., Liu, Z., Lu, Y., Hu, B., & Yu, H. (2014). Effect of naringenin on brain insulin signaling and cognitive functions in ICV-STZ induced dementia model of rats. *Neurological Sciences*, 35(5), 741–751. <https://doi.org/10.1007/s10072-013-1594-3>
- Yang, Y. M., Shang, D. S., Zhao, W. D., Fang, W. G., & Chen, Y. H. (2013). Microglial TNF- α -dependent elevation of MHC class I expression on brain endothelium induced by amyloid-beta promotes T cell transendothelial migration. *Neurochemical Research*, 38(11), 2295–2304. <https://doi.org/10.1007/S11064-013-1138-5/METRICS>
- Yang, Y., Nunes, F. A., Berencsi, K., Furth, E. E., Gönczöl, E., & Wilson, J. M. (1994). Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenoviruses for gene therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(10), 4407–4411. <https://doi.org/10.1073/PNAS.91.10.4407>
- Yao, D.-L., West, N. R., Bondy, C. A., Brenner, M., Hudson, L. D., Zhou, J., Collins, G. H., & Webster, H. de F. (1995). Cryogenic spinal cord injury induces astrocytic gene expression of insulin-like growth factor I and insulin-like growth factor binding protein 2 during myelin regeneration. *Journal of Neuroscience Research*, 40(5). <https://doi.org/10.1002/jnr.490400510>
- Yara, S., Kawakami, K., Kudeken, N., Tohyama, M., Teruya, K., Chinen, T., Awaya, A., & Saito, A. (2001). FTS reduces bleomycin-induced cytokine and chemokine production and inhibits pulmonary fibrosis in mice. *Clinical and Experimental Immunology*, 124(1). <https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.2001.01493.x>
- Yin, C., Deng, Y., Gao, J., Li, X., Liu, Y., & Gong, Q. (2016). Icariside II, a novel phosphodiesterase-5 inhibitor, attenuates streptozotocin-induced cognitive deficits in rats. *Neuroscience*, 328, 69–79. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.04.022>
- Yuste, J. E., Tarragon, E., Campuzano, C. M., & Ros-Bernal, F. (2015). Implications of glial nitric oxide in neurodegenerative diseases. In *Frontiers in Cellular Neuroscience* (Vol. 9, Issue AUGUST). <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00322>
- Zakrzewski, W., Dobrzyński, M., Szymonowicz, M., & Rybak, Z. (2019). Stem cells: Past, present, and future. In *Stem Cell Research and Therapy* (Vol. 10, Issue 1). <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1165-5>
- Zamanian, J. L., Xu, L., Foo, L. C., Nouri, N., Zhou, L., Giffard, R. G., & Barres, B. A. (2012). Genomic analysis of reactive astrogliosis. *Journal of Neuroscience*, 32(18), 6391–6410. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6221-11.2012>
- Zappa Villar, M. F., López Hanotte, J., Crespo, R., Pardo, J., & Reggiani, P. C. (2021). Insulin-like growth factor 1 gene transfer for sporadic Alzheimer's disease: New evidence for trophic factor mediated hippocampal neuronal and synaptic recovery-based behavior improvement. *Hippocampus*, 31(10). <https://doi.org/10.1002/hipo.23379>
- 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). <https://doi.org/10.1007/s00702-018-1928-7>
- Zappa Villar, M. F., López Hanotte, J., Pardo, J., Morel, G. R., Mazzolini, G., García, M. G., & Reggiani, P. C. (2020). Mesenchymal Stem Cells Therapy Improved the Streptozotocin-Induced Behavioral and

- Hippocampal Impairment in Rats. *Molecular Neurobiology*, 57(2). <https://doi.org/10.1007/s12035-019-01729-z>
- Zareba-Kozioł, M., Sz wajda, A., Dadlez, M., Wystouch-Cieszyńska, A., & Lalowski, M. (2014). Global analysis of S-nitrosylation sites in the wild type (APP) transgenic mouse brain-clues for synaptic pathology. *Molecular and Cellular Proteomics*, 13(9), 2288–2305. <https://doi.org/10.1074/mcp.M113.036079>
- Zhang, C., Xing, Z., Tan, M., Wu, Y., & Zeng, W. (2021). Roflumilast Ameliorates Isoflurane-Induced Inflammation in Astrocytes via the CREB/BDNF Signaling Pathway. *ACS Omega*, 6(6), 4167–4174. https://doi.org/10.1021/ACSOMEGA.0C04799/ASSET/IMAGES/LARGE/AO0C04799_0009.JPEG
- Zhang, L., Ma, Y., Liu, M., Ma, Y., & Guo, H. (2019). The effects of various estrogen doses on the proliferation and differentiation of cultured neural stem cells. *General Physiology and Biophysics*, 38(5), 417–425. https://doi.org/10.4149/GPB_2019022
- Zhang, L., Tan, X., Dong, C., Zou, L., Zhao, H., Zhang, X., Tian, M., & Jin, G. (2012). In vitro differentiation of human umbilical cord mesenchymal stem cells (hUCMSCs), derived from Wharton's jelly, into choline acetyltransferase (ChAT)-positive cells. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 30(6). <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2012.05.006>
- Zhang, W. W., Li, L., Li, D., Liu, J., Li, X., Li, W., Xu, X., Zhang, M. J., Chandler, L. A., Lin, H., Hu, A., Xu, W., & Lam, D. M. K. (2018). The First Approved Gene Therapy Product for Cancer Ad-p53 (Gendicine): 12 Years in the Clinic. *https://Home.Liebertpub.Com/Hum*, 29(2), 160–179. <https://doi.org/10.1089/HUM.2017.218>
- Zhang, Y., Dai, C. L., Chen, Y., Iqbal, K., Liu, F., & Gong, C. X. (2016). Intranasal Insulin Prevents Anesthesia-Induced Spatial Learning and Memory Deficit in Mice. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/SREP21186>
- Zhao, Q. F., Yu, J. T., & Tan, L. (2015). S-Nitrosylation in Alzheimer's disease. In *Molecular Neurobiology* (Vol. 51, Issue 1). <https://doi.org/10.1007/s12035-014-8672-2>
- Zhou, Y., Lekic, T., Fathali, N., Ostrowski, R. P., Martin, R. D., Tang, J., & Zhang, J. H. (2010). Isoflurane post-treatment reduces neonatal hypoxic-ischemic brain injury in rats by S1P/PI3K/Akt pathway. *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation*, 41(7), 1521. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.110.583757>
- Zhu, H., Zhang, W., Zhao, Y., Shu, X., Wang, W., Wang, D., Yang, Y., He, Z., Wang, X., & Ying, Y. (2018). GSK3 β -mediated tau hyperphosphorylation triggers diabetic retinal neurodegeneration by disrupting synaptic and mitochondrial functions. *Molecular Neurodegeneration*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/s13024-018-0295-z>
- Zhu, L., Zhang, Z., Hou, X. jie, Wang, Y. feng, Yang, J. yu, & Wu, C. fu. (2019). Inhibition of PDE5 attenuates streptozotocin-induced neuroinflammation and tau hyperphosphorylation in a streptozotocin-treated rat model. *Brain Research*, 1722. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2019.146344>
- Zott, B., Simon, M. M., Hong, W., Unger, F., Chen-Engerer, H. J., Frosch, M. P., Sakmann, B., Walsh, D. M., & Konnerth, A. (2019). A vicious cycle of β amyloid-dependent neuronal hyperactivation. *Science*, 365(6453). <https://doi.org/10.1126/science.aay0198>