



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



Estudio de modificaciones morfológicas en cerebros de ratas en un modelo preclínico de enfermedad de Alzheimer

Ciclo de Metodología Científica II-2017. Grupo 95.

Bertin, Melani

Cabral, Rossana

Chucarro, Valentina

Contreras, Nayrim

Larzabal, Romina

Montero, Mariano

Orientador: Dra. Patricia Lagos

Departamento de Fisiología - Facultad de Medicina UdelaR

INDICE

RESUMEN.....	2
INTRODUCCIÓN	3
DATOS EPIDEMIOLÓGICOS	3
¿QUE ES LA EA?.....	3
CARACTERÍSTICAS FISIOPATOLÓGICAS.....	3
TRATAMIENTOS DE LA EA.....	4
MODELOS EXPERIMENTALES PARA EL ESTUDIO DE LA EA.....	4
HORMONA CONCENTRADORA DE MELANINA Y EA.....	6
UTILIZACIÓN DE MARCADORES PARA EVIDENCIAR CAMBIOS MORFOLÓGICOS EN MODELOS DE EA.....	7
HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	8
OBJETIVO GENERAL Y ESPECÍFICOS.....	9
METODOLOGÍA	10
RESULTADOS.....	14
CONSIDERACIONES GENERALES	14
TINCIÓN HISTOLÓGICA CON NISSL.....	15
ENSAYOS INMUNOHISTOQUÍMICOS.....	17
MARCAJE MCH-Rod (+).....	22
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	23
AGRADECIMIENTOS	25
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue evidenciar, utilizando distintos marcadores, las modificaciones morfológicas producidas en el cerebro de ratas en un modelo preclínico de enfermedad de Alzheimer (EA). Se realizó la microinyección intracerebroventricular de estreptozotocina (STZ), una droga que induce déficits cognitivos similares a los encontrados en pacientes con EA y la hormona concentradora de melanina (MCH) conjugada a Rodamina (MCH-Rod), neurotransmisor con probable acción beneficiosa para la memoria. Se evaluaron algunos parámetros comportamentales y morfológicos a los 15, 30 y 60 días posteriores a la STZ, con sus respectivos controles. Posteriormente, se practicó un test comportamental de reflejos básicos, se registró la actividad locomotora, se realizó la perfusión intracardíaca de los animales para disecar el cerebro, crioprotegerlo y congelarlo. Los cortes coronales obtenidos en crióstato del hipocampo y corteza se ensayaron con la tinción de Nissl e inmunohistoquímica para identificar neuronas (NeuN), fibras colinérgicas (enzima ChAT), astrocitos (GFAP), células en apoptosis (caspasa 3-activada) y neuronas nitrérgicas (nNOS). Los test comportamentales no pusieron en evidencia diferencias significativas entre animales tratados frente a los controles. La observación cualitativa de los tejidos de animales tratados y controles no arrojó diferencias en los ensayos con la tinción de Nissl ni para la identificación de NeuN, GFAP y nNOS. En cambio, con MCH-Rod se observó un mayor número de marcas (+) en los tratados que en controles y con ChAT se observaron menor número de fibras colinérgicas en los tratados que controles. Las marcas (+) para caspasa-3 fueron más intensas en los controles que los tratados. Concluimos que, incrementando el número de animales ensayados, este modelo de EA en ratas sería una herramienta experimental óptima para el estudio de modificaciones morfológicas que ocurren en el cerebro y poder extrapolarlas a lo que ocurre en los pacientes con EA.

Palabras Clave: *Enfermedad de Alzheimer (EA), hipocampo, estreptozotocina (STZ), hormona concentradora de melanina (MCH), colina acetil transferasa (ChAT)*

INTRODUCCIÓN

La OMS define a la demencia como “síndrome –generalmente de naturaleza crónica o progresiva– caracterizado por el deterioro de la función cognitiva más allá de lo que podría considerarse una consecuencia del envejecimiento normal. La demencia afecta a la memoria, el pensamiento, la orientación, la comprensión, el cálculo, la capacidad de aprendizaje, el lenguaje y el juicio. La conciencia no se ve afectada. El deterioro de la función cognitiva suele ir acompañado, y en ocasiones es precedido, por el deterioro del control emocional, el comportamiento social o la motivación” (1).

DATOS EPIDEMIOLÓGICOS

En el mundo hay unos 47 millones de personas que padecen demencia, y cada año se registran cerca de 10 millones de nuevos casos (1). La enfermedad de Alzheimer (EA) es la forma más común de demencia y se calcula que representa entre un 60% y un 70% de los casos. Aproximadamente 10% de las personas mayores de 70 años tienen una pérdida de memoria significativa y en más de la mitad de los casos la causa es la EA (2). Para el 2011 se estimaba que en Uruguay existirían más de 30.000 dementes, con 5000 casos nuevos en ese año (3).

¿QUE ES LA EA?

La EA es una enfermedad neurodegenerativa irreversible caracterizada por un deterioro continuo y progresivo de las funciones cognitivas, principalmente de la memoria. Se han descrito dos tipos de EA, una de tipo familiar de comienzo temprano y otra de tipo esporádico de comienzo tardío (4).

CARACTERÍSTICAS FISIOPATOLÓGICAS

Las lesiones fisiopatológicas de cerebros post-mortem en pacientes con EA se caracterizan por una acumulación anormal del péptido β -amiloide, presente en las placas seniles extracelulares y de la proteína Tau truncada e hiperfosforilada presente en los ovillos neurofibrilares intracelulares, por pérdida de neuronas colinérgicas y por la presencia de microglía activada, específicamente en determinadas estructuras del sistema nervioso central (SNC) (5). Se observa a su vez una disminución en la cantidad de neuronas piramidales en distintas zonas del cerebro, como las capas II, III y V de la neocorteza, la región CA1 del hipocampo y el subiculum (6,7). Se han elaborado distintas hipótesis al respecto de la etiología de esta enfermedad. Una de ellas, la “hipótesis de la cascada de amiloide” establece que el péptido β amiloide inicia la cascada de eventos que induce una neuroinflamación, daño vascular, neurodegeneración y pérdida de

memoria (8). Esto posiciona al péptido β amiloide como el iniciador patológico de la EA, tanto familiar como esporádica, pero actualmente existen evidencias que no apoyan esta hipótesis, sosteniendo que el péptido β amiloide no es suficiente para iniciar la patogénesis en la EA esporádica (9). Otra hipótesis establece que la formación de ovillos neurofibrilares precede a los depósitos de β amiloide (10). Por otro lado se piensa que las modificaciones patológicas de la proteína tau son consecuencias de la presencia de depósitos de β amiloide, siendo la primera gran responsable de la patogenia de la enfermedad, existiendo además un *feedback* positivo entre ambos fenómenos (11). Se postulan tres mecanismos amiloide-independientes, verificados experimentalmente, cada uno de los cuales contribuye sustancialmente a la etiología de la EA: 1) pérdida de integridad del ADN, 2) regulación defectuosa del ciclo celular y 3) regresión de la mielinización (12). Por su parte, la “hipótesis colinérgica” se estableció debido al déficit colinérgico observado en cerebros de pacientes con EA y por el rol de la acetilcolina (ACh) en procesos de aprendizaje y memoria (13). A pesar de todas las hipótesis planteadas y el gran volumen de investigaciones realizadas, y publicadas en la literatura, aún se desconoce la etiología de la EA y no se ha podido encontrar una cura, lo cual denota la importancia de estudiar nuevos blancos moleculares para el desarrollo de terapias alternativas efectivas para el tratamiento de esta enfermedad.

TRATAMIENTOS DE LA EA

El tratamiento farmacológico que se utiliza actualmente en la EA está basado en torno a la hipótesis colinérgica descrita anteriormente. La enzima acetilcolinesterasa (AChE) es la enzima que cataliza la hidrólisis de la ACh a colina y ácido acético luego de ser liberada a la hendidura sináptica. De esta forma, la ACh deja de producir sus efectos sinápticos en sus neuronas blanco (14–16). Esta enzima se encuentra en diversos tejidos, como nervios y músculo, fibras sensitivas y motoras, así como en las membranas de los glóbulos rojos (14). La inactivación de la AChE produce un aumento en los niveles y en la duración del efecto de la ACh, generando una hiperestimulación de receptores nicotínicos y muscarínicos (16). Por esta razón, los inhibidores de la AChE son las principales drogas usadas actualmente, como el donepezilo, la rivastigmina y la galantamina (3,14). Otro fármaco utilizado en etapas más avanzadas de la enfermedad es la memantina, un antagonista de los receptores NMDA (3).

MODELOS EXPERIMENTALES PARA EL ESTUDIO DE LA EA

A lo largo de los años se han realizado múltiples trabajos para intentar explicar y tratar la EA. A principio de los años 90, aparecieron los primeros modelos animales con ratones transgénicos con el propósito de reproducir las características de esta patología.

Los modelos de ratones transgénicos permitieron dilucidar la vía de síntesis y secreción del APP y la producción del péptido β amiloide (17). Además aportaron evidencia sobre el rol fisiopatológico de la APP, los fragmentos de la APP y la alfa-secretasa en procesos como la neurogénesis (18,19) y el mecanismo de consolidación de la memoria (20). Hsiao utilizó ratones transgénicos que sobre-expresan la APP mostrando un depósito progresivo del β amiloide respecto a la edad (21). De todos modos, los modelos de ratones transgénicos presentan ciertas limitaciones (22), por ejemplo que solo se relacionan a la forma familiar del Alzheimer de inicio temprano (FAD), que representan un 5% de los diagnósticos, dejando un 95% de Alzheimer de tipo esporádico (SAD) (21–24). Se concluyó que la teoría de la cascada del β amiloide se correlaciona con un bajo número de casos clínicos, los conocidos FADs causados por mutaciones en genes específicos que se heredan de forma autosómica dominante y sus manifestaciones aparecen a edades más tempranas.

Dado estas limitaciones, y a la falta de elementos que explicaran el proceso neurodegenerativo en estos pacientes, estudios posteriores en cerebros post-mortem de pacientes con Alzheimer, observaron un estado de insulino-resistencia (25,26). Se observó que la insulina cumplía un rol en los niveles de β amiloide y en la hiperfosforilación de la proteína tau (26,27). La creciente evidencia apuntó a que la cascada de reacciones vinculadas a la insulina cumple un papel fundamental en la fisiopatogenia de la EA (25). Debido a que se desconoce la naturaleza específica de la EA y los eventos que precipitan su desarrollo, que los estadios iniciales son irreconocibles clínica o experimentalmente y que el estudio puede ser realizado solamente en cerebros post-mortem, surgió la necesidad de idear un modelo de estudio con animales de experimentación para proveer nueva información sobre el proceso neurodegenerativo.

En esa línea, se demostró que la inyección de la estreptozotocina (STZ) a nivel sistémico causaba destrucción de la producción y secreción de la insulina en las células β del páncreas causando una diabetes mellitus de tipo 1 (DM1). Mientras que dosis menores producían una insulino-resistencia por afectar el receptor de insulina a nivel periférico (28). Se observó que la STZ por vía intracerebroventricular (icv), inducía un estado de insulino-resistencia a nivel cerebral que alteraba el metabolismo normal de la glucosa sin producir alteraciones a nivel sistémico (29,30). Se postuló entonces un modelo no transgénico en base a la inyección icv de STZ (31). Estudios del grupo de Salkovik-Petrisic arrojaron que la STZ icv inducía alteraciones similares a las encontradas en los cerebros de humanos diagnosticados con Alzheimer mostrando el desarrollo de déficits compatibles en el aprendizaje y memoria, cambios bioquímicos y cambios morfológicos. A nivel bioquímico se observó una disminución en el uso de la glucosa a nivel cerebral, disminución de la transmisión colinérgica y aumento de los marcadores de estrés

oxidativo. Se ha utilizado a la inmunohistoquímica como método para identificar y medir marcadores específicos tanto de daño como de patrones de expresión de la enfermedad. En lo que concierne a la vía colinérgica, se observó que los animales con STZ expresaban un aumento significativo en la expresión de la enzima que sintetiza a la ACh, la colina acetiltransferasa (ChAT) en la neocorteza, los ganglios basales y también en el hipocampo (32,33). En cuanto a los aspectos morfológicos, se observó daño neuronal, disminución del volumen de neuronas en el hipocampo con astrogliosis e inflamación neuronal (34). Los animales con STZ icv respecto a los controles, mostraron un aumento significativo de los depósitos de β -amiloide en múltiples áreas cerebrales, como la corteza entorrinal, ganglios basales, hipocampo y neocorteza (32,33). De igual manera, se pudo observar un aumento en la proteína tau fosforilada en la neocorteza y los ganglios basales. Desde el punto de vista comportamental, mediante el uso del laberinto acuático de Morris, se vio un déficit progresivo del aprendizaje y la memoria de los animales tratados con STZ evidenciado particularmente en estadios tempranos, ya a partir de las 3, 4 y 24hs post inyección, comparados con los controles (32). A pesar de que se mostraron evidencias de modificaciones en los marcadores de daño, no fue posible encontrar un elemento que los vincule y desencadene el proceso del depósito de β -amiloide e hiperfosforilación de la proteína tau (34). Sin embargo, el modelo de ratas tratadas con STZ provee una evidencia de que el estado de insulino-resistencia lleva a un fenotipo similar al de la EA de tipo esporádico, con características tanto anatomopatológicas como clínicas extrapolables. Además, provee un buen modelo animal con estándares específicos y reproducibles que puede ser utilizado para probar fármacos y otros blancos terapéuticos. Este modelo se impuso sobre los modelos transgénicos que requieren manipulación genética, los cuales presentan una alta complejidad y costos asociados al mantenimiento de las colonias.

HORMONA CONCENTRADORA DE MELANINA Y EA

La hormona concentradora de melanina (MCH) es un neuromodulador presente en neuronas del área incerto-hipotalámica que envían extensas proyecciones a muchas áreas del cerebro incluido el hipotálamo, el hipocampo, estructuras del tronco encefálico, la amígdala, el núcleo accumbens y la corteza (35–38). La función biológica de la MCH es mediada por dos receptores conocidos como MCH-R1 y MCH-R2 (39–41). En mamíferos, funciona como un neurotransmisor y neuromodulador (35,42) abarcando complejos comportamientos, entre ellos el control del ciclo vigilia-sueño hasta su participación en los procesos de consolidación de la memoria (37,38). A su vez en un estudio con ratones con delección del gen del MCH-R1 se vio que dicha deficiencia genética resultaba en impedimentos de aprendizaje y memoria, lo que sugiere un rol de la MCH en la modulación de la cognición (36). Fue observado que los niveles de MCH en el líquido

cefalorraquídeo (LCR) están elevados en pacientes con EA en comparación con pacientes sanos, y a su vez se encontró una correlación entre los niveles de las proteínas T-tau y P-tau y la severidad de los síntomas de la enfermedad. Por lo tanto, la regulación de la MCH en la EA estaría alterada, generando una hipersecreción, a causa de una reducción en la disponibilidad de su receptor que se encuentra en hipocampo y corteza, lugares de mayor alteración en EA. Apoyando estas evidencias, los ratones deficientes en el receptor MCH-R1 tuvieron un mal desempeño cognitivo (43).

UTILIZACIÓN DE MARCADORES PARA EVIDENCIAR CAMBIOS MORFOLÓGICOS EN MODELOS DE EA

i. MARCADOR NEURONAL: PROTEÍNA *NeuN*

NeuN es una proteína asociada con el ADN y su inmunorreactividad se ha utilizado como un marcador para identificar neuronas maduras post-mitóticas, tanto *in vivo*, como *in vitro* (44,45). Se ha demostrado en animales de experimentación que la utilización de NeuN como marcador puede ser útil para la evaluación cuantitativa o semicuantitativa de la pérdida de células neuronales en enfermedades neurodegenerativas (45,46).

ii. MARCADOR GLIAL: PROTEÍNA *GFAP* (PROTEÍNA GLIOFIBRILAR ÁCIDA)

Diversos estudios en cerebros post-mortem de pacientes con EA han observado que la generación del péptido β -amiloide induce una astrogliosis reactiva (47). Por otra parte, en modelos preclínicos de EA en los cuales se utilizó STZ icv se observó un aumento en el número de astrocitos principalmente en el hipocampo (48).

iii. MARCADOR COLINÉRGICO: ENZIMA COLINA ACETILTRANSFERASA (ChAt)

La disminución en los niveles de la enzima ChAt, se correlaciona con el deterioro cognitivo descrito en la EA (13,49,50). En diversos estudios pre-clínicos (32,48), los niveles de ACh se encontraron disminuidos a nivel de la corteza frontal, la amígdala y del hipocampo (51,52).

iv. MARCADOR DE NEURONAS NITRÉRGICAS: ENZIMA nNOS

El óxido nítrico (NO) es un mensajero molecular gaseoso cuyas funciones dependen de la presencia de su enzima de síntesis neuronal, la nNOS y aumentos en su cantidad, parecerían tener

un efecto deletéreo generando excitación sobre los receptores NMDA de glutamato lo que causa una degeneración neuronal. En estudios previos, mediante inmunohistoquímica se observó un aumento en la cantidad de neuronas nNOS (+) en hipocampo y una disminución en la corteza frontal en pacientes con EA, comparadas dichas áreas con tejidos post-mortem de pacientes control (53).

v. MARCADOR DE APOPTOSIS: ENZIMA CASPASA 3 ACTIVADA

La apoptosis es un mecanismo de suicidio celular altamente regulado importante para múltiples procesos biológicos, entre ellos la patogénesis de la neurodegeneración (54). El efector central en la apoptosis son las caspasas, unas regulan la activación o son iniciadoras de otras caspasas (caspasas 1, 2, 4, 5, 8,9, y 10), mientras que otras regulan la fase de ejecución (caspasas 3, 6,7, y 14) (55,56), siendo la detección de su presencia en tejidos un marcador específico de apoptosis (56).

vi. MARCADOR DE NEURONAS MCH-RECEPTIVAS: *MCH-Rod*

Los receptores MCHR-1 de la MCH internalizan al ligando luego de ser activados por éste, y se ha utilizado la herramienta de la MCH conjugada con un fluoróforo, la rodamina, para identificar neuronas MCH-receptivas (células MCH-Rod +) (57). Diversas evidencias han demostrado que la MCH tiene un rol importante en los procesos de aprendizaje y memoria, específicamente actuando a nivel del hipocampo y favoreciendo los procesos mnémicos.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

Basándonos en la información disponible, así como en estudios realizados previamente, nuestra hipótesis de trabajo fue que utilizando el modelo pre-clínico de EA de administración icv de STZ en ratas y utilizando a la MCH-Rod, pondríamos en evidencia, tanto modificaciones morfológicas generadas a consecuencia de la STZ en áreas relacionadas a la memoria, así como la participación de la MCH en estas modificaciones.

OBJETIVO GENERAL Y ESPECÍFICOS

OBJETIVO GENERAL

Implementar un modelo preclínico de EA en ratas para el estudio de las modificaciones morfológicas cerebrales asociadas utilizando distintos marcadores específicos.

OBJETIVO ESPECÍFICO 1

Desarrollar destrezas de laboratorio, de investigación científica experimental y análisis de resultados.

OBJETIVO ESPECÍFICO 2

Estudiar las modificaciones morfológicas desarrolladas luego de distintos tiempos de la administración icv de STZ en la corteza cerebral e hipocampo de la rata utilizando marcadores específicos y a la MCH-Rod.

METODOLOGÍA

ANIMALES

Se utilizaron ratas macho Wistar (adultos, 250-300 gr, n=12) del Bioterio de la Facultad de Medicina, mantenidos con ciclo luz-oscuridad (12-12 horas), comida y agua *ad libitum*. El protocolo experimental fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina (CEUA; expediente 070153-000011-17).

DROGAS

La estreptozotocina (STZ, Sigma-Aldrich) se disolvió en LCRa y se administró por vía icv a la dosis de 3 mg/kg por rata (bilateral, 5µl/lado), el día 1 y el día 3 de la secuencia experimental. La MCH-Rod (Phoenix Pharmaceuticals) se disolvió en DMSO y agua destilada y se administró a una dosis de 1,2µg/µl icv de forma unilateral, 20 minutos antes de realizar la perfusión intracardíaca de los animales en los distintos grupos experimentales.

GRUPOS EXPERIMENTALES

Se trabajó con tres grupos experimentales, los cuales se trataron con STZ icv bilateral el día uno y tres de la secuencia experimental y además se les administró MCH-Rod icv unilateral el día de la perfusión. Se realizaron los test comportamentales y se procesaron los tejidos luego de 15, 30 y 60 días de la administración de STZ: STZ 15, STZ 30 y STZ 60, respectivamente. En cada uno de estos grupos (n=4 c/u), el control recibió LCRa, y el resto la STZ icv. Posteriormente se detalla el curso temporal de los procedimientos realizados en los tres grupos experimentales.

CIRUGÍA ESTEREOTÁXICA Y ADMINISTRACIÓN INTRACEREBROVENTRICULAR

Los animales se anestesiaron (ketamina 90 mg/kg y xilazina 5 mg/kg i.p.) y se les realizó la cirugía estereotáxica inyectándose por vía icv el LCRa o la STZ mediante una jeringa Hamilton en las siguientes coordenadas: AP= -1 mm desde Bregma; L= -2 y +2 mm; DV= 3.4 mm (58). Posteriormente, se trataron con antibióticos y analgésicos locales y sistémicos (Amoxicilina, clorafenicol y ketoprofeno).

Administración aguda icv bilateral de STZ: El día 1, se microinyectó la STZ, o LCRa en ambos ventrículos laterales a un flujo de 0.1 µl/min y se repitió este procedimiento el día 3, a partir del cual se contabilizaron los 15, 30 y 60 días según el grupo experimental.

Administración aguda icv unilateral de MCH-Rod: El día posterior a la realización de los ensayos comportamentales se realizó la microinyección de MCH-Rod en el ventrículo lateral izquierdo y 20 minutos después, los animales fueron perfundidos.

ENSAYOS COMPORTAMENTALES

Dependiendo del grupo experimental, a los 15, 30 y 60 días desde el día 3 de la microinyección de STZ o su vehículo y se realizaron dos test comportamentales: el test neurológico simple y el test de actividad locomotora, con el objetivo de poder valorar algún tipo de déficit cognitivo observando la actividad refleja o disminución en la actividad locomotora de los animales tratados con STZ frente a los controles. El test neurológico simple, consistió en la realización de una batería de test reflejos neurológicos para evaluar la performance sensorial de los animales: respuesta de enderezamiento, de parpadeo, respuesta auditiva, de retirada de pata y de orientación espacial. Las respuestas se evaluaron durante 5 min como presentes o ausentes (59,60). En el test de actividad locomotora se colocó al animal en una caja de las habituales del bioterio y se evaluó la actividad locomotora del animal, contabilizando el número de cruzamientos del animal sobre una grilla presente en el suelo de la caja, y movimientos estereotipados realizados (acicalamiento, movimientos verticales o “rearings”) durante 5 min (61).

PERFUSIÓN INTRACARDÍACA DE LOS ANIMALES

Luego de los 20 minutos de haber realizado la microinyección de MCH-Rod en los distintos grupos experimentales los animales fueron perfundidos intracardiamente bajo campana con NaCl al 0,9% y paraformaldehído (PFA) al 4%. De esta forma se fijaron los tejidos para su posterior procesamiento. Se disecó el encéfalo que permaneció en PFA (fijación por inmersión durante 24 horas). Las carcasas de los animales fueron depositadas en un freezer del Bioterio para su posterior descarte.

CRIOPROTECCIÓN

Se realizó el pasaje del encéfalo desde PFA al 4% a sacarosa al 30% donde permanecieron durante 48hs para su crioprotección previamente al congelado.

CONGELAMIENTO DE LOS TEJIDOS Y CORTE EN CRIOSTATO

Se congelaron los tejidos en bloques con una sustancia específica para el montaje para congelación (“tissue-tek”) en hielo seco y se almacenaron en freezer a -80 °C. Los cerebros fueron cortados en crióstato a congelación para realizar el almacenamiento posterior a 20°C en solución

anticongelante (Solución de Olmos) de los cortes coronales de 30 μm obtenidos a nivel de la corteza cerebral, hipocampo, núcleo accumbens y amígdala, entre otras estructuras (58).

ENSAYOS HISTOLÓGICOS

Para este análisis se eligieron 8 cortes coronales de cada animal conteniendo el hipocampo, corteza cerebral y otras estructuras de interés. Se realizó la tinción de los tejidos con la tinción histológica Tionina que marca los cuerpos de Nissl de las neuronas y posteriormente se visualizaron los tejidos en microscopio óptico y se obtuvieron imágenes en una lupa estereoscópica.

ENSAYOS DE INMUNOHISTOQUÍMICA

Para este análisis se eligieron 2 cortes coronales del mismo sector que para el ensayo histológico anterior, de los animales seleccionados para estudiar, siendo estos el control de 30 días y un animal tratado con STZ de 15, 30 y 60 días. Se utilizaron anticuerpos primarios anti-NeuN, para identificar neuronas, anti-GFAP para identificar astrocitos, anti-ChAT, para identificar neuronas y fibras colinérgicas, anti-caspasa 3 activada, para identificar células en apoptosis y anti-nNOS para identificar neuronas nitrérgicas.

ANÁLISIS DE CORTES ENSAYADOS

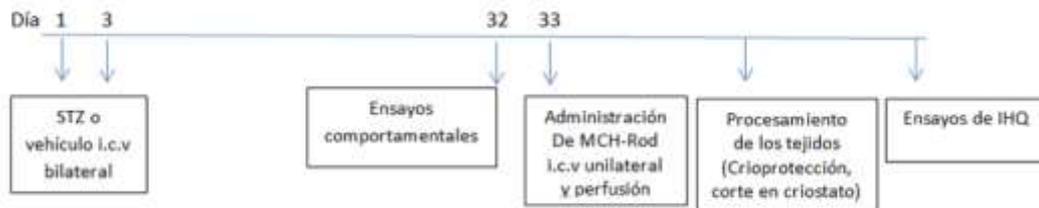
Los cortes ensayados para los distintos marcadores fueron observados en microscopio de luz donde se obtuvieron imágenes representativas de las marcas positivas a nivel de la corteza cerebral e hipocampo. También se seleccionaron cortes coronales de los distintos grupos experimentales para analizar en microscopio de fluorescencia para visualizar la presencia de la MCH-Rod en los tejidos de los animales estudiados, valorando si existen cambios entre los distintos tiempos de tratamiento y con el control en la presencia de marca fluorescente.

GRUPOS EXPERIMENTALES REALIZADOS

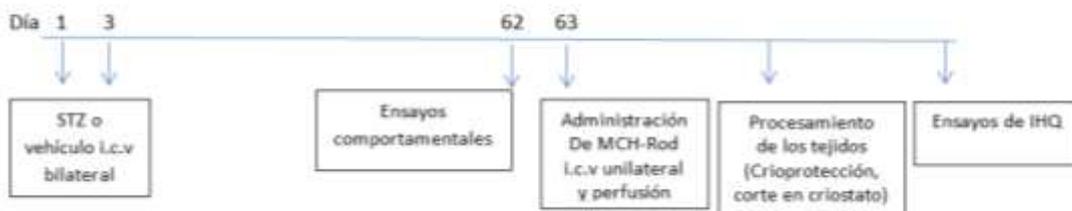
Efectos de la STZ a los 15 días de su administración i.c.v (n=4) Administración de STZ (n=3) o vehículo (LCRa, n=1) y posterior evaluación a los 15 días. La secuencia experimental realizada fue:



Efectos de la STZ a los 30 días de su administración i.c.v (n=4). Administración de STZ (n=3) o vehículo (n=1) y posterior evaluación a los 30 días. La secuencia experimental realizada fue:



Efectos de la STZ a los 60 días de su administración i.c.v (n=4). Administración de STZ (n=3) o vehículo (n=1) y posterior evaluación a los 60 días. La secuencia experimental realizada fue:



RESULTADOS

CONSIDERACIONES GENERALES

Todas las técnicas realizadas desde la cirugía estereotáxica, la perfusión de los animales, procesamiento de tejidos y técnicas de inmunohistoquímica funcionaron adecuadamente según lo previsto.

TEST COMPORTAMENTALES

i. TEST NEUROLÓGICO SIMPLE

En los animales de todos los grupos experimentales, previo al registro de la actividad locomotora, se registró si estaban presentes o ausentes los reflejos analizados y especificados en la metodología. Todos estuvieron presentes en la totalidad de los animales sin registrarse diferencias entre los animales controles y tratados con STZ. Esto está de acuerdo con los resultados del trabajo de Galeano y colaboradores (60) en el que utilizan un modelo transgénico de EA.

ii. TEST DE ACTIVIDAD LOCOMOTORA

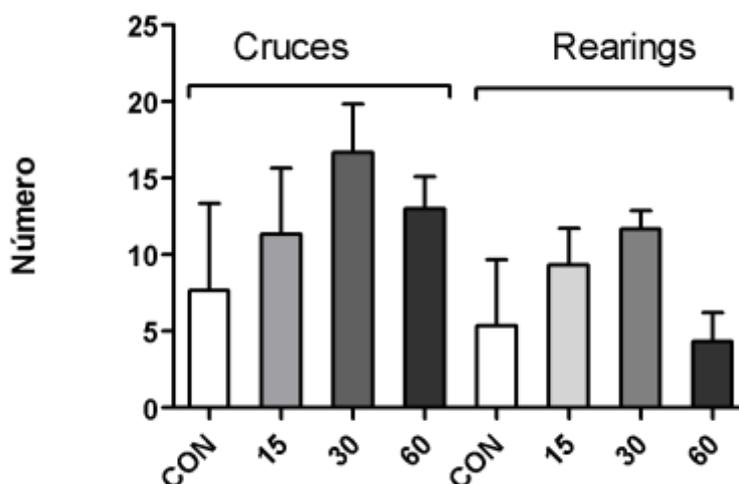


Figura 1. Actividad locomotora horizontal y actividad exploratoria vertical (“*rearings*”) analizada en animales control y a los 15, 30 y 60 días luego de la microinyección con STZ.

Las primeras 4 barras corresponden al número de cruces realizados por los animales en la caja de comportamiento en los 5 minutos evaluados. Las cuatro últimas barras corresponden al número de levantamientos verticales (“*rearings*”) realizados durante el mismo tiempo. Los resultados mostrados como control corresponden al promedio de la actividad de los tres animales controles, cada uno de ellos correspondiente a cada grupo experimental, mientras que los resultados de 15,

30 y 60 días corresponden al promedio de la actividad de los tres animales tratados. Observamos que el número de cruces registrado por los animales en los tres grupos tratados con STZ es mayor que en el grupo control, donde se evidencia un gran desvío estándar. El grupo de STZ 30 fue el que presentó una tendencia mayor al aumento de su actividad locomotora. En el grupo de STZ 15 también se observó un aumento del número de cruces con respecto al control, siendo que el grupo de STZ 60 la actividad locomotora disminuyó, observándose una tendencia a ser menor inclusive que el control. En cuanto a los levantamientos verticales (*rearings*), el grupo de STZ 30 también fue en el que se registró un mayor número de *rearings* seguido del grupo de 15 días, luego el control (con gran mayor desvío estándar), encontrándose con menor número en el grupo de 60 días. No obstante en el trabajo de Mayer y colaboradores en el que compararon la actividad locomotora de animales controles y tratados con STZ icv no fue igual, los controles mostraron una secuencia de inspección más cuidadosa con mayor duración de la actividad observándose mayores periodos de inactividad en los animales tratados con STZ (62).

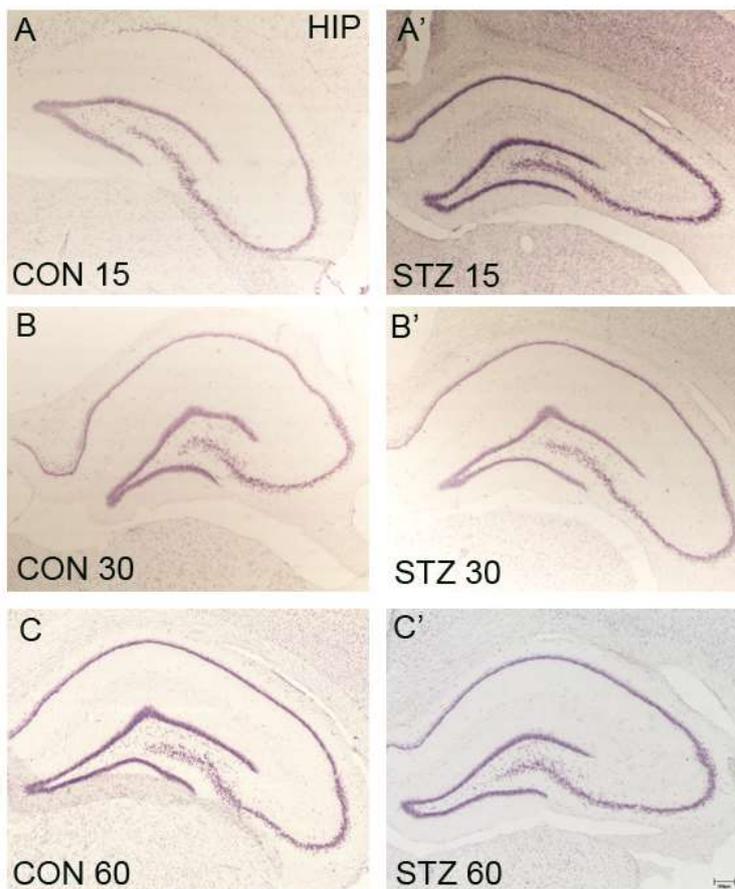


Figura 2. Fotos representativas de cortes de hipocampo de animales de cada grupo experimental con tinción Nissl. Hipocampo control de 15 días (A) y tratado con STZ 15 días (A'). Hipocampo de control de 30 días (B) y tratado con STZ 30 días (B'). Hipocampo de control de 60 días (C) y tratado con STZ de 60 días (C'). Barra de calibración de 200µm.

TINCIÓN HISTOLÓGICA CON NISSL

La técnica de tinción con Tionina fue positiva en todos los tejidos. En las *figuras 2 y 3* se muestran las fotos de cortes representativos de hipocampo y CA junto con DG respectivos, de los distintos grupos experimentales observándose una tinción de mayor intensidad en las neuronas piramidales del CA (*flecha azul*) y en las células granulosas del GD (*flecha roja*) sin registrarse diferencias cualitativas en el número de neuronas marcadas o la intensidad de la tinción al comparar entre controles y tratados.

En la *figura 4* donde se muestran fotos de cortes representativos de corteza medial de los distintos grupos experimentales se observan las neuronas de las distintas capas de la corteza con diferentes grados de intensidad de tinción siendo mayor en las neuronas, piramidales de las capas 2 y 4 que corresponden a la granular externa e interna respectivamente. No se observaron diferencias notorias cualitativas entre los distintos animales estudiados. Sería importante poder cuantificar el número de neuronas marcadas con esta tinción en las estructuras de interés, como el hipocampo y corteza, a fin de poder obtener datos del posible efecto de la STZ sobre el número de células viables. Así también, podría analizarse el espesor del cuerpo caloso y de la corteza entre los distintos grupos, pues existen evidencias de que la STZ podría inducir a una disminución de dicho espesor (63).

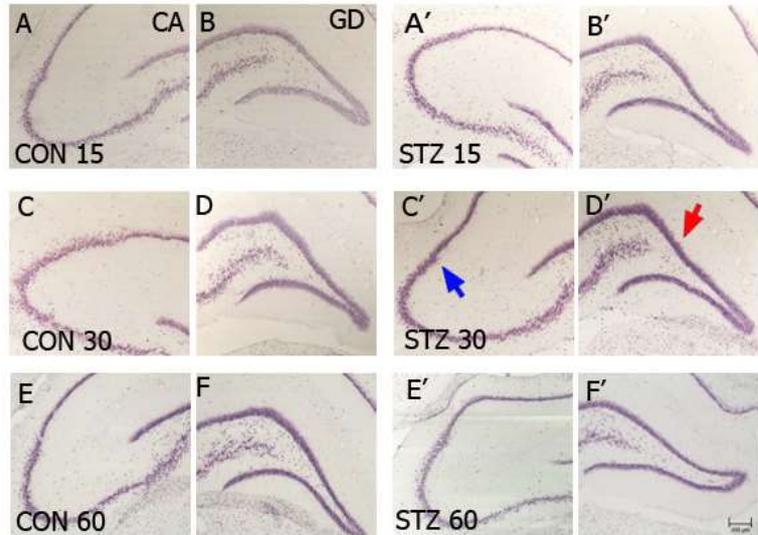


Figura 3. Fotos representativas del cuerpo de Amón (CA) y giro dentado (GD) de los hipocampos de animales de cada grupo experimental con tinción Nissl. CA de animal control de 15 días (A) y tratados con STZ 15 días (A'). GD de animal control de 15 días (B) y tratado con STZ 15 días (B'). CA de animal control de 30 días (C) y tratados con STZ 30 días (C'). GD de animal control de 30 días (D) y tratados con STZ 30 días (D'). CA de animal control de 60 días (E) y tratados con STZ de 60 días (E'). GD de animal control de 60 días (F) y tratados con STZ 60 días (F'). La flecha azul indica neuronas piramidales y la flecha roja células granulosas. Barra de calibración de 200µm.

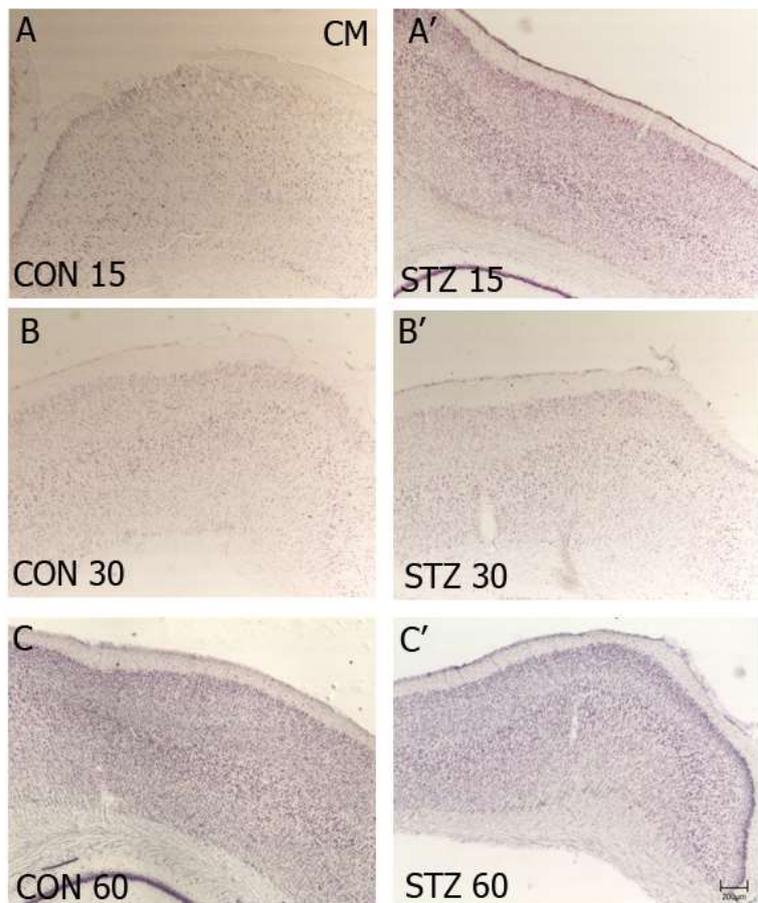


Figura 4. Fotos representativas de cortes de corteza medial de cada grupo experimental con tinción Nissl. Corteza medial de animal control de 15 días (A) y tratado con STZ de 15 días (A'). Corteza medial de animal control de 30 días (B) y tratado con STZ de 30 días (B'). Corteza medial de animal control de 60 días (C) y tratado con STZ de 60 días (C'). Barra de calibración de 200µm.

ENSAYOS INMUNOHISTOQUÍMICOS

De modo general se destaca que en todos los ensayos de inmunohistoquímica se obtuvieron resultados positivos y que dichos marcadores estaban presentes en las estructuras subcelulares (núcleos, citoplasmas, fibras) correspondientes a las marcadas en ensayos anteriores realizados en el laboratorio y a lo estipulado en la hoja de datos de cada anticuerpo primario. En esta oportunidad, no se muestran los resultados obtenidos en los controles negativos correspondientes a cada uno de los ensayos inmunohistoquímicos, donde no se observó reacción positiva en ausencia del anticuerpo primario.

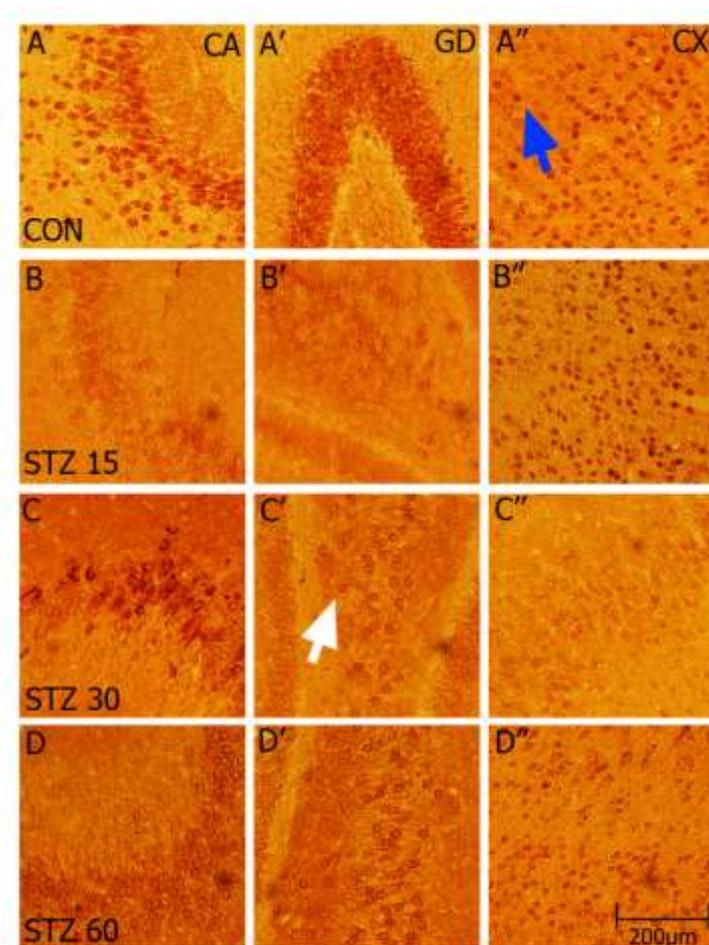


Figura 5. Fotos representativas de cortes conteniendo CA, GD y corteza medial ensayados para detectar NeuN por inmunohistoquímica (detección de neuronas). CA de animal control (A), tratado con STZ de 15 días (B), STZ de 30 días (C) y STZ de 60 días (D). GD de animal control (A'), tratado con STZ de 15 días (B'), STZ de 30 días (C') y STZ de 60 días (D'). Corteza medial de animal control (A''), tratado con STZ de 15 días (B''), STZ de 30 días (C'') y STZ de 60 días (D''). La flecha blanca indica la región perinuclear, y la azul corresponde a la marca nuclear.

i. INMUNOHISTOQUÍMICA PARA DETECCIÓN DE NeuN

En la *figura 5*, se observan fotos correspondientes a cortes representativos que incluyen al cuerpo de Ammón (CA), giro dentado (GD) y corteza medial con inmunohistoquímica anti-NeuN para la detección de neuronas. Podemos observar que existen distintos fenotipos y tamaños de neuronas NeuN (+), algunas en las que la marca se observa con mayor intensidad en el sector perinuclear, marcando el citoplasma (flecha blanca) y otras a nivel nuclear (flecha azul). No se evidencian de forma cualitativa diferencias en la marca entre los cortes correspondientes al animal control y los animales tratados,

por lo que en un análisis posterior con mayor número de animales que nos permita cuantificar diferencias en el número de neuronas en las diferentes estructuras estudiadas esperamos encontrar una disminución neuronal como consecuencia del proceso de neurodegeneración como se observó en trabajos previos (45,46), y poder cuantificar si se

evidencia una mayor disminución, cuanto mayor sea el tiempo post microinyección de STZ como se registró en el trabajo de Rostami (48).

ii. INMUNOHISTOQUÍMICA PARA DETECCIÓN DE GFAP

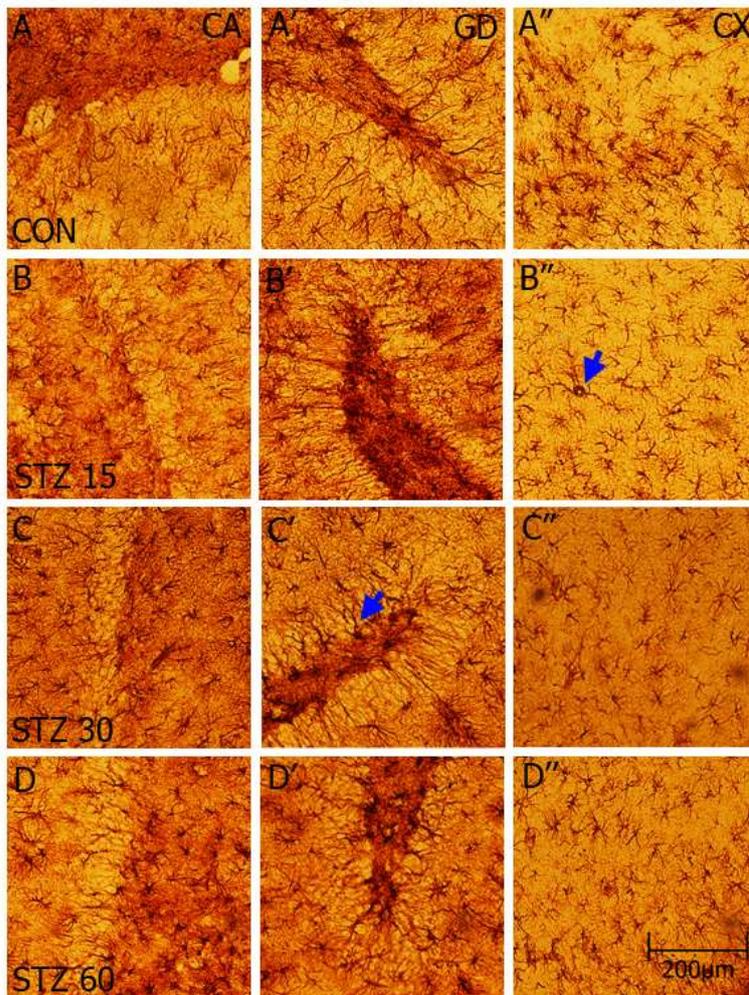


Figura 6. Fotos representativas de CA, GD y Corteza medial con inmunohistoquímica anti GFAP para la detección de astrocitos. CA de animal control (A), tratado con STZ de 15 días (B), STZ de 30 días (C) y STZ de 60 días (D). GD de animal control (A''), tratado con STZ de 15 días (B''), STZ de 30 días (C'') y STZ de 60 días (D''). Corteza medial de animal control (A'''), tratado con STZ de 15 días (B'''), STZ de 30 días (C''') y STZ de 60 días (D'''). Las flechas azules indican astrocitos.

En la *figura 6* se observan fotos obtenidas de cortes representativos de CA, GD y corteza medial con inmunohistoquímica anti-GFAP para la detección de astrocitos en las distintas estructuras ensayadas. De forma general y cualitativa, se observa una mayor densidad de astrocitos presentes en el GD en todos los cortes como se demostró en el trabajo de Rostami (48). Sin embargo, no se observaron diferencias cualitativas notorias al comparar la presencia de astrocitos y su cantidad (indicado con **flecha azul**) entre los diferentes grupos experimentales en ninguno de los tejidos ensayados.

Estudios realizados

evidenciaron un aumento en el número de astrocitos en el hipocampo el cual no estuvo vinculado al tiempo esperado luego de la microinyección sino a la dosis de STZ utilizada observándose a mayores dosis, mayor astrogliosis (48), evidencia que nos gustaría poder verificar en nuestro modelo de EA en un análisis posterior de carácter cuantitativo.

iii. INMUNOHISTOQUÍMICA PARA DETECCIÓN DE ChAT

En la *figura 7* se observan las fotos obtenidas de cortes representativos de CA, GD y corteza medial con inmunohistoquímica anti-ChAT para la detección de neuronas y fibras colinérgicas.

Se destacan diferencias cualitativas entre la cantidad de fibras colinérgicas (señaladas con **flecha roja**) presentes en el hipocampo de los tejidos analizados de los animales controles contra los de

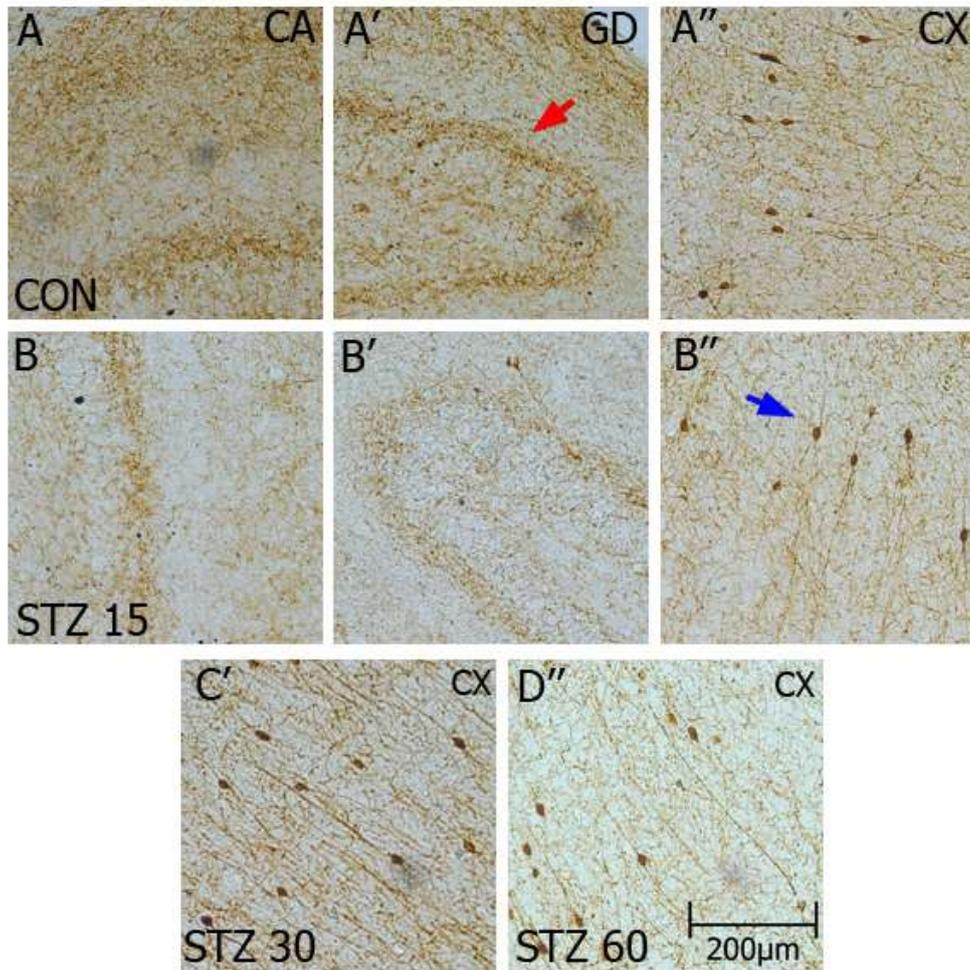


Figura 7. Fotos representativas de CA, GD y Corteza medial con inmunohistoquímica anti ChaT para la detección de neuronas colinérgicas. CA de animal control (A) y tratado con STZ de 15 días (B). GD de animal control (A') y tratado con STZ de 15 días (B'). Corteza medial de animal control (A''), tratado con STZ de 15 días (B''), STZ de 30 días (C') y STZ de 60 días (D''). La flecha roja indica fibras nerviosas y la azul neuronas.

los animales tratados con STZ de 15 días. Dicha diferencia en la densidad de fibras colinérgicas también la observamos en los cortes de corteza presentando el animal control mayor densidad de fibras que los tejidos de los animales de los grupos STZ 15, 30 y 60 días, acercándonos de forma cualitativa a los resultados encontrados en la bibliografía en los que evidencian una disminución de fibras y neuronas colinérgicas (13,49,50), lo cual puede ser consecuencia de una disminución del ARN mensajero de la ChAT (48). Así también, a nivel de la corteza se visualiza la presencia de neuronas colinérgicas marcadas con el anticuerpo anti-ChAt (señaladas con **flecha azul**) sin identificarse diferencias morfológicas en estas, entre los tejidos correspondientes a los diferentes grupos experimentales.

iv. INMUNOHISTOQUÍMICA PARA DETECCIÓN DE nNOS

En la *figura 8* se observan las fotos correspondientes a los cortes representativos de CA, GD y corteza medial con inmunohistoquímica anti-nNOS para la detección de neuronas nitrérgicas (señaladas con **flecha roja**). Dichas neuronas marcadas presentaron una distribución relativamente homogénea en las estructuras analizadas de los distintos grupos y no pudieron ponerse en evidencia diferencias cualitativas en el número o morfología de dichas neuronas como se obtuvo en estudio de cerebros post-mortem de pacientes con EA en los que se observó una disminución del número de neuronas nitrérgicas en el hipocampo y un aumento a nivel de la corteza frontal.

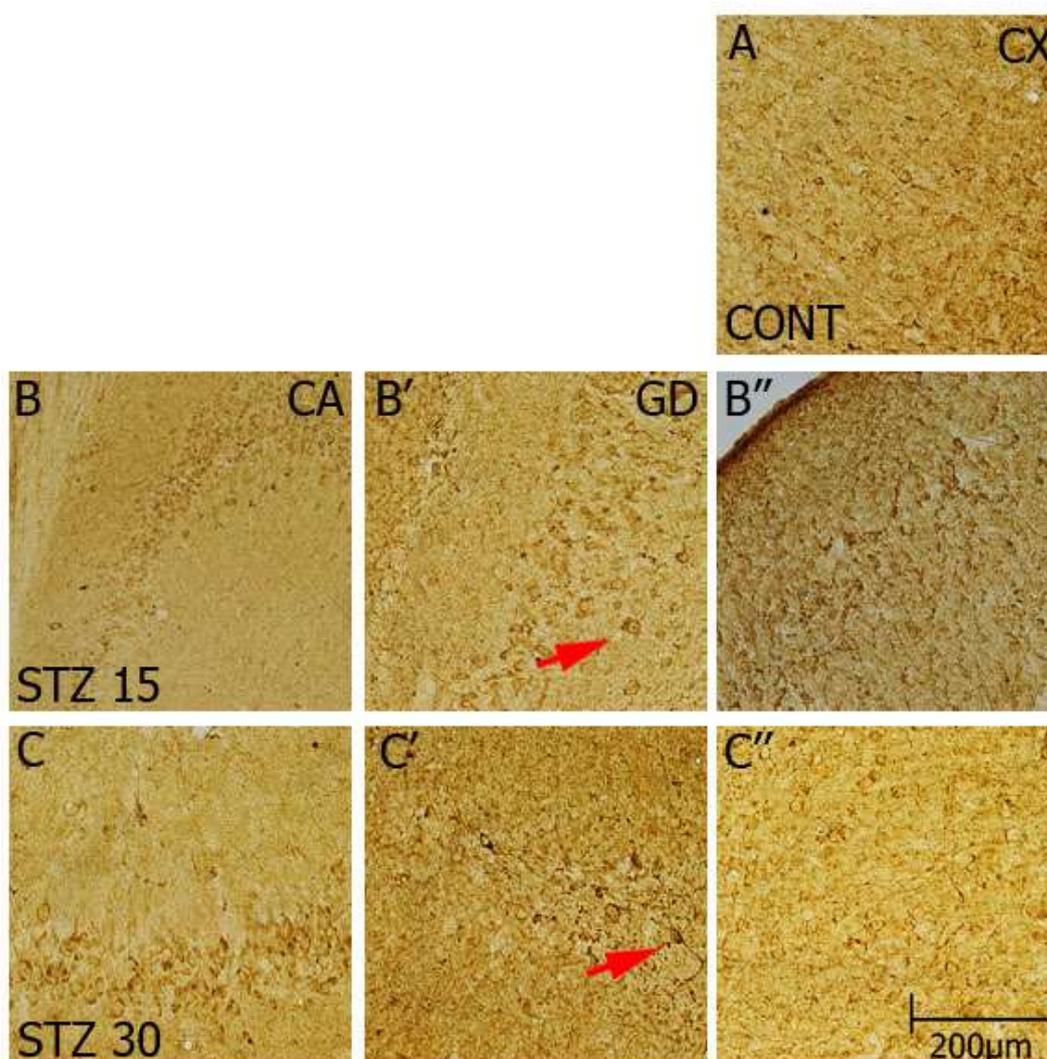


Figura 8. Fotos representativas de CA, GD y Corteza medial con inmunohistoquímica anti nNos para la detección de neuronas nitrérgicas. Corteza medial de animal control (A), tratado con STZ de 15 días (B'') y STZ de 30 días (C''). CA de animal tratado con STZ de 15 días (B) y STZ de 30 días (C). GD de animal tratado con STZ de 15 días (B') y STZ de 30 días (C'). Las flechas rojas indican neuronas nitrérgicas.

(53).

v. INMUNOHISTOQUÍMICA PARA DETECCIÓN DE CASPASA 3 ACTIVADA

En la *figura 9* se observan fotos obtenidas de cortes representativos de CA, GD y corteza medial con inmunohistoquímica anti-caspasa 3-activada para la detección de células en proceso de apoptosis celular (señalada con **flecha azul**) en todos los tejidos estudiados. Se observa un aumento en la densidad e intensidad de la marca tanto en hipocampo como en corteza de los tejidos correspondientes a los grupos de STZ 15 y 30 días en relación al control. Mientras que en los tejidos pertenecientes al grupo STZ 60 días se visualiza una disminución en la densidad e intensidad de la marca observándose una menor intensidad de la marca positiva que en los tejidos control. En otros modelos de EA distintos al utilizado en nuestro trabajo, se observó un aumento del número de células en apoptosis como consecuencia del proceso de neurodegeneración en la EA (64).

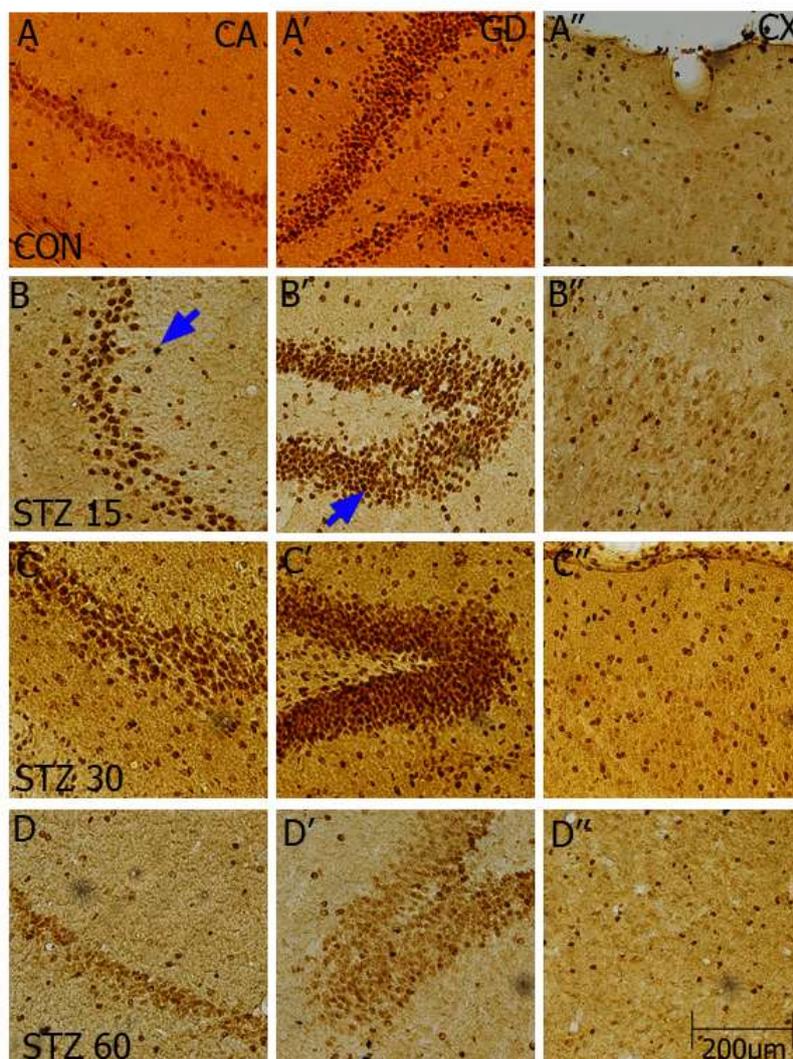


Figura 9. Fotos representativas de CA, GD y Corteza medial con inmunohistoquímica anti Caspasa 3 activada para la detección de apoptosis celular. CA de animal control (A), tratado con STZ de 15 días (B), STZ de 30 días (C) y STZ de 60 días (D). GD de animal control (A'), tratado con STZ de 15 días (B'), STZ de 30 días (C') y STZ de 60 días (D'). Corteza medial de animal control (A''), tratado con STZ de 15 días (B''), STZ de 30 días (C'') y STZ de 60 días (D''). Las flechas azules indican neuronas en apoptosis.

MARCAJE MCH-Rod (+)

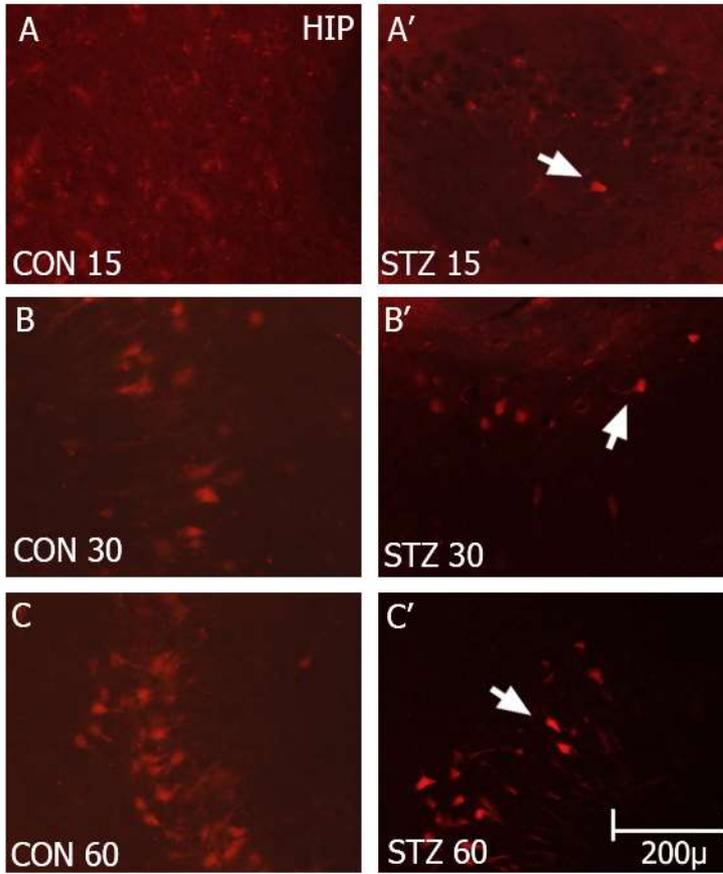


Figura 10. Presencia de marca positiva de MCH-Rod en hipocampos de cada grupo experimental. Hipocampo control de 15 días a 20X (A) y 40X (B). Hipocampo tratado con STZ de 15 días a 20X (A') y 40X (B'). Hipocampo control de 30 días a 20X (C) y 40X (D). Hipocampo tratado con STZ de 30 días a 20X (C') y 40X (D'). Hipocampo control de 60 días a 20X (E) y 40X (F). Hipocampo tratado con STZ de 60 días a 20X (E') y 40X (F'). Las flechas blancas indican neuronas MCH-Rod positivas.

En la *figura 10* se observan las fotos obtenidas de los cortes representativos de hipocampo de cada grupo experimental donde se pudo evidenciar la presencia de marcas MCH-Rod (+). Se observan varias neuronas MCH-Rod (+) (señaladas con flecha blanca) en los tejidos estudiados. Los tejidos de los tres animales controles correspondientes a 15, 30 y 60 días presentaron una mayor densidad de neuronas MCH-Rod (+) con respecto al tejido del animal tratado correspondiente. Entre los tejidos de los animales tratados con STZ, se visualiza de forma cualitativa un

aumento creciente de la densidad de neuronas MCH-Rod (+) entre los tejidos de 15 a 60 días. No existen muchas evidencias científicas que vinculen a la EA con la inervación MCHérgica del hipocampo, por lo que nos interesa para trabajos posteriores realizar un estudio cuantitativo que permita verificar la tendencia observada, con el objetivo de valorar qué relación existe entre la MCH y la EA, pensando en la posibilidad de plantearse a este neuropéptido capaz de mejorar la capacidad cognitiva de esta enfermedad neurodegenerativa investigando sobre esta función de la MCH en el aprendizaje y memoria encontrada en ratones con delección del gen MCH-R1 (36).

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

TESTS COMPORTAMENTALES

El test neurológico simple realizado no puso en evidencia la presencia de alternaciones en la actividad refleja entre los animales controles y los tratados con STZ. Si bien se observan algunas diferencias en la actividad locomotora de los animales de los distintos grupos experimentales, el número de animales ensayados en este estudio experimental no fue suficiente para realizar un análisis estadístico que nos permitiera correlacionar la actividad locomotora del animal con algún déficit cognitivo producido por la STZ. Por dicha razón, se debería aumentar el número de animales para poder confirmar la tendencia observada, y consideramos que podría ser una importante herramienta para próximos experimentos realizar la filmación del test para disminuir el error del experimentador al cuantificar las variables registradas, lo cual se realizó de forma presencial.

TINCIÓN HISTÓLOGICA CON NISSL

Del análisis cualitativo de los cortes marcados con tionina y de las fotos obtenidas, no se observaron diferencias cualitativas significativas entre las estructuras analizadas.

ENSAYOS DE INMUNOHISTOQUÍMICA

La observación cualitativa de los tejidos de animales tratados y controles no arrojó diferencias en los ensayos de inmunohistoquímica para la identificación de NeuN, GFAP y nNOS. En cambio, con ChAT se observó un menor número de fibras colinérgicas en los tratados que controles. Las marcas (+) para caspasa-3 fueron más intensas en los controles que los tratados.

MARCAJE MCH-Rod (+)

De forma cualitativa, se observó que el número de neuronas MCH-Rod (+) fue menor en los hipocampos provenientes de los tres grupos tratados comparados con sus respectivos controles. Esta observación sugeriría que el tratamiento con STZ estaría induciendo a una disminución en el número de neuronas que son MCH-receptivas presentes en dichos tejidos, evidenciado por la internalización del conjugado MCH con rodamina. Dentro de los grupos tratados con STZ, se observó que, a pesar de esa disminución en el número de neuronas MCH-Rod (+), el grupo de STZ 60 presentó el mayor número de estas neuronas cuando comparadas con STZ15 y 30. Esta observación podría deberse a que, a los 60 días, ya la STZ no produce sus efectos induciendo neurodegeneración o que así fuere, las neuronas MCH-receptivas no son su blanco de acción.

Tanto con los ensayos histológicos y de inmunohistoquímica sería necesario realizar una valoración cuantitativa de los cambios morfológicos observados en los tejidos analizados, que nos permita un análisis estadístico de los resultados obtenidos para lo cual deberíamos elegir cortes de todos los animales, sacarles fotos y luego elegir determinadas áreas para ser cuantificadas con un programa específico para ello como el ImageJ. Así también, sería imprescindible aumentar el número de animales estudiados en todos los grupos, principalmente los controles. Debido al poco tiempo y recursos disponibles no fue posible en una primera aproximación a la investigación científica, realizar experimentos con un mayor número de animales ni realizar los análisis cuantitativos de los distintos ensayos.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a los Departamentos de Bioquímica, de Histología y Embriología y al Servicio de Microscopía de la Facultad de Medicina de la Universidad de la República por permitirnos el uso de los microscopios de fluorescencia y la lupa para la obtención de las imágenes de los cortes ensayados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. OMS | Demencia. WHO [Internet]. 2017 [cited 2017 Oct 6]; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs362/es/>
2. Seeley W, Miller B. Dementia. In: Longo D, Kasper D, Jameson L, Fauci A, Hauser S, Loscalzo J, editors. Harrison's principles of internal medicine. 18th ed. McGraw Hill Medical; 2012. p. 3300–16.
3. Fontán L. La enfermedad de Alzheimer: elementos para el diagnóstico y manejo clínico en el consultorio. Biomedicina [Internet]. 2012;7(1):34–43. Available from: <http://www.um.edu.uy/docs/alzheimer.pdf>
4. Daisy D, Luis A, Brusco I, Fuentes P, Dra G, Mariella G, et al. La enfermedad de Alzheimer, diagnóstico y tratamiento: una perspectiva latinoamericana. [cited 2017 Oct 7]; Available from: <http://www.renacen.com/pdf/medicos-novedades/LaEnfermedadDeAlzheimer.pdf>
5. De Strooper B. Proteases and proteolysis in Alzheimer disease: a multifactorial view on the disease process. *Physiol Rev* [Internet]. 2010 Apr 1 [cited 2017 Oct 7];90(2):465–94. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20393191>
6. Hoyer S. Neurodegeneration, Alzheimer's disease, and Beta-amyloid toxicity. *Life Sci* [Internet]. 1994;55(25/26):1977–83. Available from: <http://www.psychiatrist.com/jcp/article/Pages/2003/v64s09/v64s0902.aspx>
7. Mountjoy CQ, Roth M, Evans NJ, Evans HM. Cortical neuronal counts in normal elderly controls and demented patients. *Neurobiol Aging* [Internet]. 1983 [cited 2017 Oct 6];4(1):1–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6877482>
8. Hardy JA, Higgins GA. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* [Internet]. 1992 Apr 10 [cited 2017 Oct 7];256(5054):184–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1566067>
9. Castello MA, Soriano S. On the origin of Alzheimer's disease. Trials and tribulations of the amyloid hypothesis. *Ageing Res Rev* [Internet]. 2014 Jan [cited 2017 Oct 7];13:10–2. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24252390>
10. Price JL, Morris JC. So what if tangles precede plaques? *Neurobiol Aging* [Internet]. 2004 Jul 1 [cited 2017 Oct 7];25(6):721–3–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15165694>
11. Bloom GS. Amyloid- β and Tau. *JAMA Neurol* [Internet]. 2014 Apr 1 [cited 2017 Oct 7];71(4):505.

- Available from:
<http://archneur.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jamaneurol.2013.5847>
12. Tse K-H, Herrup K. Re-imagining Alzheimer's disease - the diminishing importance of amyloid and a glimpse of what lies ahead. *J Neurochem* [Internet]. 2017 Jun 21 [cited 2017 Oct 7]; Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/jnc.14079>
 13. Baskin DS, Browning JL, Pirozzolo FJ, Korporaal S, Baskin JA, Appel SH. Brain choline acetyltransferase and mental function in Alzheimer disease. *Arch Neurol* [Internet]. 1999 Sep 1 [cited 2017 Oct 6];56(9):1121–3. Available from: <http://archneur.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/archneur.56.9.1121>
 14. Colović MB, Krstić DZ, Lazarević-Pašti TD, Bondžić AM, Vasić VM. Acetylcholinesterase inhibitors: pharmacology and toxicology. *Curr Neuropharmacol* [Internet]. 2013 May [cited 2017 Oct 6];11(3):315–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24179466>
 15. McHardy SF, Wang H-YL, McCowen S V., Valdez MC. Recent advances in acetylcholinesterase Inhibitors and Reactivators: an update on the patent literature (2012-2015). *Expert Opin Ther Pat* [Internet]. 2017 Apr 3 [cited 2017 Oct 6];27(4):455–76. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/13543776.2017.1272571>
 16. Lazarevic-Pasti T, Leskovic A, Momic T, Petrovic S, Vasic V. Modulators of Acetylcholinesterase Activity: from Alzheimer's Disease to Anti-cancer Drugs. *Curr Med Chem* [Internet]. 2017 Jul 5 [cited 2017 Oct 6];24. Available from: <http://eurekaselect.com/153798>
 17. Lannfelt L, Folkesson R, Mohammed AH, Winblad B, Hellgren D, Duff K, et al. Alzheimer's disease: molecular genetics and transgenic animal models. *Behav Brain Res* [Internet]. 1993 Nov 30 [cited 2017 Oct 9];57(2):207–13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8117426>
 18. Lazarov O, Marr RA. Neurogenesis and Alzheimer's disease: at the crossroads. *Exp Neurol* [Internet]. 2010 Jun [cited 2017 Oct 9];223(2):267–81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19699201>
 19. Zhou Z, Chan CH, Ma Q, Xu X, Xiao Z, Tan E. The roles of amyloid precursor protein (APP) in neurogenesis: Implications to pathogenesis and therapy of Alzheimer disease. *Cell Adh Migr* [Internet]. 2011 [cited 2017 Oct 9];5(4):280–92. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21785276>
 20. Korte M, Herrmann U, Zhang X, Draguhn A. The role of APP and APLP for synaptic transmission, plasticity, and network function: lessons from genetic mouse models. *Exp Brain Res* [Internet]. 2012 Apr 18 [cited 2017 Oct 9];217(3–4):435–40. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00221-011-2894-6>
 21. Hsiao K, Chapman P, Nilsen S, Eckman C, Harigaya Y, Younkin S, et al. Correlative memory deficits, Abeta elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science* [Internet]. 1996 Oct 4 [cited 2017 Oct 9];274(5284):99–102. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8810256>
 22. Balducci C, Forloni G. APP Transgenic Mice: Their Use and Limitations. *NeuroMolecular Med*

- [Internet]. 2011 Jun 9 [cited 2017 Oct 9];13(2):117–37. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s12017-010-8141-7>
23. Braidy N, Muñoz P, Palacios AG, Castellano-Gonzalez G, Inestrosa NC, Chung RS, et al. Recent rodent models for Alzheimer's disease: clinical implications and basic research. *J Neural Transm* [Internet]. 2012 Feb 16 [cited 2017 Oct 9];119(2):173–95. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00702-011-0731-5>
 24. Zahs KR, Ashe KH. “Too much good news” - are Alzheimer mouse models trying to tell us how to prevent, not cure, Alzheimer's disease? *Trends Neurosci* [Internet]. 2010 Aug 1 [cited 2017 Oct 9];33(8):381–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20542579>
 25. FROLICH L, BLUM-DEGEN D, RIEDERER P, HOYER S. A Disturbance in the Neuronal Insulin Receptor Signal Transduction in Sporadic Alzheimer's Disease. *Ann N Y Acad Sci* [Internet]. 1999 Nov 1 [cited 2017 Oct 9];893(1 OXIDATIVE/ENE):290–3. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1749-6632.1999.tb07839.x>
 26. Hoyer S. Glucose metabolism and insulin receptor signal transduction in Alzheimer disease. *Eur J Pharmacol* [Internet]. 2004 Apr 19 [cited 2017 Oct 9];490(1–3):115–25. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014299904002067?via%3Dihub>
 27. de la Monte SM, Wands JR. Review of insulin and insulin-like growth factor expression, signaling, and malfunction in the central nervous system: Relevance to Alzheimer's disease. *J Alzheimer's Dis* [Internet]. 2005 Mar 3 [cited 2017 Oct 9];7(1):45–61. Available from: <http://www.medra.org/servlet/aliasResolver?alias=iospress&doi=10.3233/JAD-2005-7106>
 28. Szkudelski T. The Mechanism of Alloxan and Streptozotocin Action in B Cells of the Rat Pancreas. *Physiol Res* [Internet]. 2001 [cited 2017 Oct 9];50:536–46. Available from: <http://www.biomed.cas.cz/physiolres/s.htm>
 29. Blondel O, Portha B. Early appearance of in vivo insulin resistance in adult streptozotocin-injected rats. *Diabete Metab* [Internet]. [cited 2017 Oct 9];15(6):382–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2697607>
 30. Giorgino F, Chen JH, Smith RJ. Changes in tyrosine phosphorylation of insulin receptors and a 170,000 molecular weight nonreceptor protein in vivo in skeletal muscle of streptozotocin-induced diabetic rats: effects of insulin and glucose. *Endocrinology* [Internet]. 1992 Mar 1 [cited 2017 Oct 9];130(3):1433–44. Available from: <https://academic.oup.com/endo/article-lookup/doi/10.1210/endo.130.3.1531627>
 31. Lannert H, Hoyer S. Intracerebroventricular administration of streptozotocin causes long-term diminutions in learning and memory abilities and in cerebral energy metabolism in adult rats. *Behav Neurosci* [Internet]. 1998 [cited 2017 Oct 9];112(5):1199–208. Available from: <http://doi.apa.org/getdoi.cfm?doi=10.1037/0735-7044.112.5.1199>
 32. Santos T de O, Mazucanti CHY, Xavier GF, da Silva Torrão A. Early and late neurodegeneration and memory disruption after intracerebroventricular streptozotocin. *Physiol Behav* [Internet]. 2012;107(3):401–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.physbeh.2012.06.019>
 33. Salkovic-Petrisic M, Knezovic A, Hoyer S, Riederer P. What have we learned from the

- streptozotocin-induced animal model of sporadic Alzheimer's disease, about the therapeutic strategies in Alzheimer's research. *J Neural Transm* [Internet]. 2013 Jan 12 [cited 2017 Oct 9];120(1):233–52. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00702-012-0877-9>
34. Salkovic-Petrisic M, Hoyer S. Central insulin resistance as a trigger for sporadic Alzheimer-like pathology: an experimental approach. *J Neural Transm Suppl* [Internet]. 2007 [cited 2017 Oct 9];(72):217–33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17982898>
 35. Bittencourt J, Presse F, Arias C, Peto C, Vaughan J, Nahon J, et al. The melanin concentrating hormone system of the rat brain An immuno and hybridisation histochemical characterisation.pdf. *J Comp Neurol*. 1992;319:218–45.
 36. Adamantidis A, Thomas E, Foidart A, Tyhon A, Coumans B, Minet A, et al. Disrupting the melanin-concentrating hormone receptor 1 in mice leads to cognitive deficits and alterations of NMDA receptor function. *Eur J Neurosci* [Internet]. 2005;21(10):2837–44. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15926931>
 37. Torterolo P, Lagos P, Monti JM. Melanin-concentrating hormone: a new sleep factor? *Front Neurol* [Internet]. 2011 [cited 2017 Oct 6];2:14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21516258>
 38. Devera A, Pascovich C, Lagos P, Falconi A, Sampogna S, Chase MH, et al. Melanin-concentrating hormone (MCH) modulates the activity of dorsal raphe neurons. *Brain Res* [Internet]. 2015 Feb [cited 2017 Oct 6];1598:114–28. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006899314017399>
 39. Saito Y, Nagasaki H. The Melanin-Concentrating Hormone System and Its Physiological Functions. In: Orphan G Protein-Coupled Receptors and Novel Neuropeptides [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; [cited 2017 Oct 6]. p. 159–79. Available from: http://link.springer.com/10.1007/400_2007_052
 40. Pablo T, Santiago C, Patricia L. Hormona concentradora de melanina (MCH): neuropéptido hipotalámico que facilita la generación del sueño. *rev mex neur* [Internet]. 2010 [cited 2017 Oct 6];11(1):46–51. Available from: <http://www.medigraphic.com/pdfs/revmexneu/rmn-2010/rmn101i.pdf>
 41. Zeilinger M, Dumanic M, Pichler F, Budinsky L, Wadsak W, Pallitsch K, et al. In vivo evaluation of radiotracers targeting the melanin-concentrating hormone receptor 1: [(11)C]SNAP-7941 and [(18)F]FE@SNAP reveal specific uptake in the ventricular system. *Sci Rep* [Internet]. 2017 Aug 14 [cited 2017 Oct 6];7(1):8054. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28808288>
 42. Kawachi H, Kawazoe I, Tsubokawa M, Kishida M, Baker BI. Characterization of melanin-concentrating hormone in chum salmon pituitaries. Vol. 305, *Nature*. 1983. p. 321–3.
 43. Schmidt FM, Kratzsch J, Gertz HJ, Tittmann M, Jahn I, Pietsch UC, et al. Cerebrospinal Fluid Melanin-Concentrating Hormone (MCH) and Hypocretin-1 (HCRT-1, Orexin-A) in Alzheimer's Disease. *PLoS One*. 2013;8(5):1–6.
 44. Darlington PJ, Goldman JS, Cui QL, Antel JP, Kennedy TE. Widespread immunoreactivity for neuronal nuclei in cultured human and rodent astrocytes. *J Neurochem*. 2008;104(5):1201–9.

45. Wolf HK, Buslei R, Schmidt-Kastner R, Schmidt-Kastner PK, Pietsch T, Wiestler OD, et al. NeuN: a useful neuronal marker for diagnostic histopathology. *J Histochem Cytochem*. 1996;44(10):1167–71.
46. Beliczai Z, Varszegi S, Gulyas B, Halldin C, Kasa P, Gulya K. Immunohistoblot analysis on whole human hemispheres from normal and Alzheimer diseased brains. *Neurochem Int*. 2008;53(6–8):181–3.
47. Rodríguez JJ, Olabarria M, Chvatal A, Verkhatsky A. Astroglia in dementia and Alzheimer’s disease. *Cell Death Differ* [Internet]. 2009;16(3):378–85. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/cdd.2008.172>
48. Rostami F, Javan M, Moghimi A, Haddad-Mashadrizheh A, Fereidoni M. Streptozotocin-induced hippocampal astrogliosis and insulin signaling malfunction as experimental scales for subclinical sporadic Alzheimer model. *Life Sci* [Internet]. 2017; Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0024320517304198>
49. PERRY EK, PERRY RH, BLESSED G, TOMLINSON BE. CHANGES IN BRAIN CHOLINESTERASES IN SENILE DEMENTIA OF ALZHEIMER TYPE. *Neuropathol Appl Neurobiol* [Internet]. 1978 Jul 1 [cited 2017 Oct 6];4(4):273–7. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2990.1978.tb00545.x>
50. Wilkinson DG, Francis PT, Schwam E, Payne-Parrish J. Cholinesterase inhibitors used in the treatment of Alzheimer’s disease: the relationship between pharmacological effects and clinical efficacy. *Drugs Aging* [Internet]. 2004;21(7):453–78. Available from: <http://link.springer.com/10.2165/00002512-200421070-00004%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15132713>
51. Davies P, Maloney AJF. Selective Loss of Central Cholinergic Neurons in Alzheimer’S Disease. *Lancet*. 1976;308(8000):1403.
52. Nitsch R, Hoyer S. Local action of the diabetogenic drug, streptozotocin, on glucose and energy metabolism in rat brain cortex. *Neurosci Lett*. 1991;128:199–202.
53. Yew DT, Wong HW, Li WP, Lai HWL, Yu WHA. Nitric oxide synthase neurons in different areas of normal aged and Alzheimer’s brains. *Neuroscience*. 1999;89(3):675–86.
54. Wyllie AH. Apoptosis and the regulation of cell numbers in normal and neoplastic tissues: an overview. *Cancer Metastasis Rev* [Internet]. 1992 Sep [cited 2017 Oct 9];11(2):95–103. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1394797>
55. García-Villalobos A, Custodio N, Montesino S R. Apoptosis y Caspasas en Enfermedad de Alzheimer. *Rev Per Neurol* [Internet]. 2000 [cited 2017 Oct 9];6(1–2):24–9. Available from: http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/neurologia/v06_n1-2/apoptosis_casp.htm
56. Gown AM, Willingham MC. Improved Detection of Apoptotic Cells in Archival Paraffin Sections: Immunohistochemistry Using Antibodies to Cleaved Caspase 3. *J Histochem Cytochem* [Internet]. 2002 Apr 26 [cited 2017 Oct 9];50(4):449–54. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/002215540205000401>
57. Ruiz-Viroga. Estudios in vivo de la internalización de la hormona concentradora de melanina

- (MCH) y su receptor MCHR-1 en el Sistema Nervioso Central de la rata. 2017.
58. Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates: Handbook of Clinical Neurology Series*. 5th ed. Elsevier Academic Press, editor. 2005. 166 p.
 59. Cohen RM, Rezai-Zadeh K, Weitz TM, Rentsendorj A, Gate D, Spivak I, et al. A transgenic Alzheimer rat with plaques, tau pathology, behavioral impairment, oligomeric $\text{A}\beta$, and frank neuronal loss. *J Neurosci* [Internet]. 2013 Apr 10 [cited 2017 Oct 9];33(15):6245–56. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23575824>
 60. Galeano P, Martino Adami P V, Do Carmo S, Blanco E, Rotondaro C, Capani F, et al. Longitudinal analysis of the behavioral phenotype in a novel transgenic rat model of early stages of Alzheimer's disease. *Front Behav Neurosci* [Internet]. 2014 [cited 2017 Oct 9];8:321. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25278855>
 61. Ferreira A, Picazo O, Uriarte N, Pereira M, Fernández-Guasti A. Inhibitory effect of buspirone and diazepam, but not of 8-OH-DPAT, on maternal behavior and aggression. *Pharmacol Biochem Behav*. 2000;66(2):389–96.
 62. Mayer G, Nitsch R, Hoyer S. Effects of changes in peripheral and cerebral glucose metabolism on locomotor activity, learning and memory in adult male rats. *Brain Res*. 1990;532(1–2):95–100.
 63. Knezovic A, Osmanovic-Barilar J, Curlin M, Hof PR, Simic G, Riederer P, et al. Staging of cognitive deficits and neuropathological and ultrastructural changes in streptozotocin-induced rat model of Alzheimer's disease. *J Neural Transm*. 2015;122(4):577–92.
 64. Xu P, Wang K, Lu C, Dong L, Gao L, Yan M, et al. Protective effects of linalool against amyloid beta-induced cognitive deficits and damages in mice. *Life Sci* [Internet]. 2017;174:21–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2017.02.010>