



Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas
Sub-área: Biología Celular y Molecular

**PERFIL COMPORTAMENTAL EN TESTS DE ANSIEDAD Y EXPRESIÓN DE LAS
PROTEÍNAS DE SEÑALIZACIÓN CaMKII, CaMKIV, CREB Y BDNF EN DIFERENTES
REGIONES DEL CEREBRO DE RATONES DIABÉTICOS**

Lic. Camila Espasandín Cola

Orientador: Dr. Juan Pablo Damián, PhD.

**Unidad Académica de Bioquímica, Departamento de Biociencias Veterinarias
Facultad de Veterinaria, Universidad de la República**

Co-orientador: Juan Claudio Benech, PhD.

**Laboratorio de Señalización Celular y Nanobiología
Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable**

Tribunal de defensa de tesis:

Natalia Uriarte, PhD.

Flavio Zolessi, PhD.

Daniella Agrati, PhD.

Montevideo, Uruguay

2022

Tabla de contenido

Resumen	4
Summary	5
Introducción.....	6
Diabetes mellitus	6
Clasificación y etiología	6
<i>Diabetes mellitus tipo 1 o insulino dependiente</i>	7
<i>Diabetes mellitus tipo 2 o no insulino dependiente</i>	8
<i>Otros tipos de diabetes mellitus</i>	8
Comorbilidad ligada a la diabetes mellitus en el Sistema Nervioso Central	9
<i>Ansiedad y diabetes mellitus</i>	9
<i>Control nervioso de la ansiedad</i>	11
<i>Estrés y diabetes mellitus</i>	13
Señalización celular y diabetes mellitus	16
Calcio y calmodulina	17
Familia de las quinasas dependientes de Ca ²⁺ /Calmodulina	18
<i>Algunas CaM quinasas multifuncionales</i>	20
Proteína quinasa dependiente de Ca ²⁺ /Calmodulina de tipo II	20
Proteína quinasa dependiente de Ca ²⁺ /Calmodulina de tipo IV	22
Proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc	23
Factor neurotrófico derivado del cerebro.....	24
Hipótesis	26
Objetivos.....	26
Objetivo general	26
Objetivos específicos.....	26
Materiales y métodos.....	27
Mantenimiento de animales.....	27
Inducción de diabetes y determinación de glicemia y peso corporal.....	27
Pruebas de comportamiento	28
Prueba de Campo Abierto.....	29
Prueba de Laberinto Elevado en Cruz.....	29
Obtención de muestras	30
Homogeneizados	32
Cuantificación de proteínas totales	32
SDS-PAGE	32
Western blot	33

Cortes histológicos e inmunofluorescencia.....	34
Microscopía Láser Confocal.....	34
Análisis estadístico.....	34
Resultados	36
Variables fisiológicas	36
Glicemia	36
Peso corporal.....	36
Parámetros de comportamiento.....	37
Prueba de Campo Abierto.....	37
Prueba de Laberinto Elevado en Cruz.....	38
Determinación de proteínas de señalización.....	40
Inmunodetección de proteínas en el hipocampo.....	40
Inmunodetección de proteínas en la amígdala.....	40
Inmunodetección de proteínas en la corteza prefrontal	41
Inmunodetección de proteínas en el hipotálamo.....	41
Microscopía Láser Confocal	42
Discusión	46
Perfil comportamental.....	46
Inmunodetección de proteínas.....	48
Conclusiones.....	54
Perspectivas.....	55
Agradecimientos.....	56
Referencias	57

Resumen

La prevalencia de la diabetes mellitus (DM) ha aumentado en las últimas décadas, estimándose que para el año 2045, 700 millones de personas padecerán dicha enfermedad. La DM genera efectos a nivel del sistema nervioso central, tanto en vías moleculares como en la manifestación de alteraciones afectivo/emocionales (ansiedad y depresión). El objetivo de este trabajo fue determinar si el perfil comportamental en dos pruebas de ansiedad y la abundancia relativa de proteínas de señalización CaMKII, CaMKIV, CREB, y BDNF en diferentes regiones cerebrales vinculadas a la ansiedad, se afecta en un modelo murino de DM tipo 1 inducida con estreptozotocina (STZ). Luego de tres meses de hiperglicemia crónica, se realizaron en ratones las pruebas de Campo Abierto (*Open field*, OF) y Laberinto Elevado en Cruz (*Elevated Plus Maze*, EPM). Los ratones inyectados con STZ presentaron un perfil comportamental de tipo ansioso, evidenciado por una menor frecuencia de *grooming* y una tendencia a manifestar *freezing* con mayor frecuencia en el OF, así como una menor frecuencia y una disminución en el tiempo de permanencia en los brazos abiertos en el EPM, al compararlos con ratones control. La abundancia relativa, determinada por inmunodetección, de algunas de las proteínas analizadas, se vio afectada por la DM en diferentes regiones del cerebro: los ratones con DM tuvieron una menor cantidad de CaMKIV en el hipocampo, una mayor abundancia de CREB total en la amígdala y el hipotálamo, así como una menor relación pCREB/CREB en el hipotálamo en comparación con ratones control. No se encontraron diferencias significativas en la presencia de CaMKII y BDNF en ninguna de las regiones cerebrales evaluadas entre ratones con y sin DM. A su vez, se realizó un análisis exploratorio de la localización de CaMKIV por inmunofluorescencia en cortes histológicos de hipocampo de los animales, y se evidenciaron cambios en la distribución de dicha proteína. En conclusión, los ratones con DM presentaron un perfil comportamental de tipo ansioso y diferencias en la inmunodetección de CaMKIV (menor en hipocampo) y CREB (mayor en amígdala e hipotálamo) en diferentes regiones del cerebro claves en la regulación de la ansiedad. Este es el primer trabajo que evaluó CaMKIV en el cerebro de un modelo animal de DM, así como de CREB en la amígdala e hipotálamo.

Palabras clave: diabetes, Sistema Nervioso Central, ratón, comportamiento de tipo ansioso, señalización celular.

Summary

The prevalence of diabetes mellitus (DM) has increased in recent decades, being estimated that 700 million people will suffer from this disease in 2045. Central nervous system effects of DM are manifested in both molecular pathways and affective/emotional alterations (anxiety and depression). The objective of this work was to determine if streptozotocin (STZ)-induced type 1 DM mice presented an altered behavioral profile in two anxiety tests as well as if the relative abundance of CaMKII, CaMKIV, CREB, and BDNF signaling proteins in different brain regions linked to anxiety were affected. After three months of chronic DM, the Open Field (OF) and Elevated Plus Maze (EPM) tests were performed on mice. The mice with DM presented an anxious-type behavioral profile, evidenced by a lower frequency of grooming and a tendency to manifest freezing more frequently in the OF, as well as a lower frequency and time in the EPM open arms, when compared to control mice. The immunodetection of some proteins was affected by DM in different brain regions: STZ induced DM mice had a lower CaMKIV in the hippocampus, higher CREB in the amygdala and hypothalamus, as well as a lower pCREB/CREB ratio in the hypothalamus compared to control mice. No significant differences were found in CaMKII or BDNF levels in any evaluated brain region between mice with and without DM. In addition, an exploratory analysis of CaMKIV localization was performed by immunofluorescence in hippocampal histological sections, and changes in CaMKIV distribution were evidenced. In conclusion, DM mice showed an anxious-type behavioral profile and changes in CaMKIV (lower in hippocampus) and CREB immunodetection (higher in amygdala and hypothalamus) in different key brain regions in the regulation of anxiety. This is the first work that assessed the abundance of CaMKIV in the brain of animals with DM, as well as of CREB in the amygdala and hypothalamus of diabetic animals.

Introducción

Diabetes mellitus

La diabetes mellitus (DM) se define como un desorden metabólico de múltiples etiologías que se caracteriza por una disfunción celular en el transporte y/o la utilización de glucosa, debido ya sea a defectos en la secreción de la hormona insulina, como a una disminución de la sensibilidad de los tejidos a la misma (Alberti & Zimmet, 1998, Pamidi & Satheesha Nayak, 2012). La principal función de la insulina es disminuir los niveles de glicemia a través de la activación de receptores transportadores de glucosa, así como estimular o inhibir diferentes vías en el metabolismo celular. Altos niveles de glicemia inducen la secreción de insulina por parte de las células β pancreáticas, siendo la señal metabólica para que la glucosa sea internalizada en las células. Una vez ingresada a la célula, la glucosa puede ser degradada para la obtención de energía vía glucólisis, o conservada en forma de glucógeno (Santoro et al., 2021; Sylow et al., 2021). La falta de insulina o la incapacidad de las células para responder a ella deriva en altos niveles de glucosa en sangre o hiperglicemia, el cual es un indicador clínico de DM (American Diabetes Association, 2014).

El desarrollo de esta enfermedad se ha asociado con factores tanto genéticos como ambientales (Villeneuve et al., 2011). La DM es una de las enfermedades crónicas más comunes en todos los países, considerándose uno de los principales problemas de salud mundial. Actualmente afecta a millones de personas en el mundo y su prevalencia ha ido en aumento en las últimas décadas (Glovaci et al., 2019). En este sentido, según datos proporcionados por la Federación Internacional de Diabetes (2019), aproximadamente 500 millones de personas en todo el mundo viven con DM. Se estima que esta cifra aumente a 578 millones de personas para el año 2030, y a 700 millones para 2045 (Federación Internacional de Diabetes, 2019).

Clasificación y etiología

La DM puede clasificarse en diferentes categorías: DM tipo 1 (DM1), tipo 2 (DM2), gestacional, y otros tipos que se deben a causas específicas y que presentan menor prevalencia (Alberti & Zimmet, 1998; American Diabetes Association, 2015).

Diabetes mellitus tipo 1 o insulino dependiente

La DM tipo 1 o insulino dependiente (DM1) se caracteriza por una combinación de predisposición genética y destrucción inmunológica de las células β , con una insuficiencia gradual y finalmente completa de insulina (Maahs et al., 2010). A menudo se desarrolla de manera repentina y puede producir síntomas como polidipsia, poliuria, enuresis, falta de energía, cansancio extremo, polifagia, pérdida de peso repentina, curación lenta de heridas, infecciones frecuentes, visión borrosa, deshidratación severa, y cetoacidosis diabética en niños y adolescentes (Kharroubi & Darwish, 2015).

Dentro de la DM1, se han reportado tres subclasificaciones: autoinmune, idiopática y fulminante.

La DM autoinmune representa aproximadamente el 5-10% de los casos de DM (Daneman, 2006; Maahs et al., 2010; Waddingham et al., 2015) y se desencadena por una destrucción autoinmune de las células β del páncreas, productoras de insulina (Devendra et al., 2004; Daneman, 2006; Atkinson et al., 2014), principalmente a través de una respuesta inflamatoria mediada por linfocitos T, así como una respuesta humoral por los linfocitos B (Devendra et al., 2004). Este tipo de DM se caracteriza por la presencia de autoanticuerpos que pueden reaccionar tanto contra células de los islotes de Langerhans o contra la insulina, como también contra la enzima ácido glutámico descarboxilasa, proteínas tirosin fosfatasas y la proteína transportadora de zinc. Estos autoanticuerpos pancreáticos, cuyo rol en la patogenia de la enfermedad no está claro, pueden ser detectados en el suero de pacientes meses o años antes del desarrollo de la hiperglicemia o de los signos clínicos (Couper & Donaghue, 2009). Se caracteriza por una hipoinsulinemia permanente y la necesidad completa de insulina exógena para mantener el control glicémico.

Por otro lado, la DM idiopática es una forma inusual de DM1, de origen desconocido (idiopático) y menos severo que la DM autoinmune. Individuos con este tipo de DM presentan mayormente descendencia africana o proveniente de Asia y sufren grados variables de deficiencia de insulina y cetoacidosis episódica (Daneman, 2006).

La DM fulminante tiene algunas características comunes con la DM idiopática (no mediada por autoinmunidad). Se caracteriza por altos niveles de glucosa en sangre y la aparición de cetoacidosis poco después del inicio de la hiperglicemia. Tanto factores genéticos como ambientales, especialmente la infección viral, han sido implicados en la enfermedad (Kharroubi & Darwish, 2015). Respecto a lo anterior, la respuesta inmune antiviral puede desencadenar la destrucción de las células β pancreáticas a través de una reacción inmune

acelerada sin autoanticuerpos detectables contra las células β pancreáticas (Kharroubi & Darwish, 2015).

Diabetes mellitus tipo 2 o no insulino dependiente

La DM tipo 2 o no insulino dependiente (DM2) representa el 90-95% de los casos de DM y es iniciado por la interacción de factores genéticos, ambientales y de estilo de vida, y aumenta con el envejecimiento (Waddingham et al., 2015). Aunque la etiología específica no se conoce, no ocurre destrucción autoinmune de las células β , e involucra individuos que tienen resistencia a la insulina (incapacidad de las células del cuerpo de responder totalmente a dicha hormona) y generalmente deficiencia relativa de insulina (no absoluta) (American Diabetes Association, 2015; International Diabetes Federation, 2019). Esta DM se desarrolla debido a mecanismos descompensatorios en la secreción de insulina, inducidos por dicha resistencia (Maahs et al., 2010; Villeneuve et al., 2011). A pesar de que los pacientes con este tipo de DM puedan llegar a tener niveles de insulina en sangre normales o incluso elevados, al presentar resistencia a la insulina, provoca que esos niveles no se logren compensar ante aumentos de glucosa en sangre (American Diabetes Association, 2015). Esta respuesta maladaptativa resulta en hiperglicemia.

Otros tipos de diabetes mellitus

La DM gestacional se diagnostica en el segundo o tercer trimestre de gestación, no siendo una DM que se manifieste claramente (American Diabetes Association, 2015). Suele ocurrir en pacientes que presenten resistencia a la insulina de manera pre-existente, o que aparece en la gestación, y que genera una capacidad reducida para secretar insulina (Panaitescu et al., 2021). A su vez, mujeres que hayan padecido DM gestacional en un embarazo previo se encuentran con un mayor riesgo de desarrollar DM2 posteriormente (Panaitescu et al., 2021).

Hay también otros tipos de DM, los cuales se deben a causas específicas: defectos monogénicos que causan disfunción de las células β , como la DM del neonato y la DM que se da en la madurez (MODY, del inglés *Maturity-Onset Diabetes of the Young*), representan menos del 5% de los pacientes con DM, y se caracterizan por la aparición abrupta de hiperglicemia, generalmente antes de los 25 años (American Diabetes Association, 2015). La DM relacionada con la fibrosis quística (CFRD, por sus siglas en inglés) se da en alrededor de un 20% de adolescentes y 40-50% de adultos con dicha enfermedad; la insuficiencia de insulina debido a la destrucción fibrótica parcial de los islotes de Langerhans es el defecto primario en la CFRD (American Diabetes Association, 2015).

Comorbilidad ligada a la diabetes mellitus en el Sistema Nervioso Central

Tradicionalmente se ha considerado a la nefropatía, la neuropatía, la retinopatía y la cardiomiopatía diabéticas como comorbilidades de la DM (Rubler et al., 1972; Biessels et al., 1994; Villeneuve et al., 2011). Sin embargo, son cada vez más reconocidos los efectos de la DM sobre el Sistema Nervioso Central (SNC) y especialmente en el cerebro (Reagan., 2012; Nasrolahi et al., 2019). Los efectos a largo plazo de esta enfermedad en el cerebro se manifiestan a nivel estructural, neurofisiológico y comportamental (Biessels et al., 1994; Kamal et al., 2000; Saravia et al., 2004; Beauquis et al., 2006; Reagan, 2012). La DM está asociada con deterioros moderados de la función cognitiva y un riesgo elevado de sufrir trastornos afectivos/emocionales (Biessels et al., 1994; Northam et al., 2006). Estudios epidemiológicos han descrito afecciones psicológicas como la depresión y la ansiedad en pacientes con DM, lo cual tiene un impacto importante en la morbilidad y mortalidad de quienes padecen dicha enfermedad (Anderson et al., 2001; Khuwaja et al., 2010; Smith et al., 2013), siendo dos veces más alta en pacientes con DM que en la población general (Pamidi & Satheesha Nayak, 2012; Caliskan, et al., 2019). La depresión y la DM comórbidas tienen una peor prognosis comparado a cuando cada enfermedad ocurre de manera separada, y la ansiedad frecuentemente ocurre en comorbilidad con síntomas de depresión (Robinson et al., 2018). Una actividad reducida de la insulina en el SNC probablemente contribuya a las consecuencias neurológicas de la DM (Biessels et al., 2008; Reagan et al., 2008). Un mal manejo de la DM que resulta en hiperglicemia crónica y/o episodios de hipoglicemia debido al tratamiento con insulina, también podrían promover las complicaciones neurológicas (Reagan, 2012).

Ansiedad y diabetes mellitus

Uno de los trastornos psiquiátricos más comunes en todo el mundo es el trastorno de ansiedad, y suele ocurrir en personas que padecen enfermedades crónicas como DM (Khuwaja et al., 2010; Smith et al., 2013), por lo que se considera que una complicación de la DM podría ser la existencia de un mayor riesgo de desarrollar trastornos de ansiedad. En individuos sanos, la ansiedad puede ser considerada como un estado emocional aversivo que se experimenta ante situaciones nuevas, intensas y/o amenazantes, siendo un componente del repertorio normal de los animales para hacer frente a situaciones potencialmente peligrosas (Rosen & Schulkin, 1998; Barlow, 2002; Hohoff, 2009). Las reacciones de ansiedad combinan una variedad de componentes del dominio fisiológico, cognitivo, emocional y conductual (Hohoff, 2009). Las respuestas fisiológicas y comportamentales que componen el estado de ansiedad son desde el punto de vista evolutivo, normales y adaptativas (Rosen &

Schulkin, 1998). Sin embargo, si la ansiedad supera los parámetros considerados normales en cuanto a intensidad, frecuencia o duración, u ocurre vinculada a estímulos no amenazantes, provoca manifestaciones patológicas en el individuo. La ansiedad patológica, según Ohl et al. (2007), “es una emoción disfuncional y aversiva persistente, incontrolable, excesiva, inapropiada y generalizada, que desencadena respuestas fisiológicas y conductuales carentes de valor adaptativo. La conducta patológica relacionada con la ansiedad es una respuesta a la anticipación o percepción exagerada de las amenazas, que es inconmensurable con la situación real”. En humanos, la ansiedad se considera patológica cuando se manifiesta durante al menos seis meses, de acuerdo al Manual Diagnóstico y Estadístico de Desórdenes Mentales (American Psychiatric Association, 1994), describiéndose principalmente por un estado emocional negativo asociado con una sensación de incontrolabilidad, y se caracteriza por hipervigilancia que sugiere una predisposición a responder al peligro, un sesgo a los estímulos amenazantes, y una incapacidad de concentrarse en tareas diarias; también involucra emociones como culpa, vergüenza y furia (Rosen & Schulkin, 1998).

Existen distintos tipos de comportamientos que son usados como indicadores de ansiedad en animales (Tabla 1). Tiene manifestaciones parecidas al miedo y, como se muestra en la Figura 1, la base estructural reside en los circuitos neuronales relacionados con la respuesta al miedo (Rosen & Schulkin, 1998; Wu et al., 2008). Ambos casos implican situaciones de peligro, sensaciones de aprensión, reacciones fisiológicas y respuestas motoras, resultando en la expresión de una variedad de comportamientos adaptativos que tienen como objetivo escapar de la fuente de peligro (Rosen & Schulkin, 1998; Ohl et al., 2007). Sin embargo, aunque la ansiedad y el miedo comparten similares respuestas fisiológicas, existen algunas diferencias entre ellos. El miedo es desencadenado por un estímulo específico definido que es reconocido por el individuo, resultando en respuestas defensivas activas que disminuyen gradualmente al desaparecer dicho estímulo (Ohl et al., 2007; Dias et al., 2013). La ansiedad, por contraparte, se relaciona con la anticipación de peligros futuros que potencialmente podrían amenazar los intereses vitales de un organismo, siendo estímulos generales e inespecíficos (Ohl et al., 2007; Dias et al., 2013).

Tabla 1. Parámetros de comportamiento cuya frecuencia tiende a incrementarse en animales con un perfil de tipo ansioso (adaptado de Ohi et al., 2007).

Comportamiento de inmovilidad (<i>freezing</i>)	Micción
Deambulación	Defecación
Jadeo	Agresión
Irritabilidad	Vigilancia/atención
Inquietud	Trastornos del sueño

Dentro de los modelos animales que se utilizan para generar DM, uno muy caracterizado es la inducción mediante inyección de estreptozotocina (STZ) en roedores (Bequer et al., 2016) para inducir DM1 (Marfella et al., 2004; Akbarzadeh et al., 2007). Este fármaco provoca necrosis de las células β pancreáticas, lo que resulta en hipoinsulinemia e hiperglucemia (Revsin et al., 2008; Gupta et al., 2014). En este modelo se han obtenido resultados similares a lo reportado en humanos, en donde la DM inducida se asocia con deterioro cognitivo (Miyata et al., 2006) y con comportamientos de tipo ansioso, miedo y estrés, evaluado con diferentes pruebas de comportamiento como el Campo Abierto o el Laberinto Elevado en Cruz (Ramanathan et al., 1998; Miyata et al., 2006; Damián et al., 2014; Gupta et al., 2014; Aswar et al., 2017; Rebai et al., 2017).

Control nervioso de la ansiedad

A nivel del cerebro, se conoce que la amígdala (estructura del sistema límbico), está involucrada en el comportamiento emocional, y parece ser clave en la modulación de la ansiedad (Figura 1) (Davis, 1992). Es una estructura que está implicada en el procesamiento de las entradas neuronales de otras partes del cerebro como el tálamo, la corteza o el hipocampo, en iniciar señales de salida a los núcleos que responden y generar diversas respuestas fisiológicas que incluyen respuestas conductuales, autónomas y hormonales relacionadas con la ansiedad (Wu et al., 2008). La amígdala está conformada por diferentes núcleos, que interaccionan. La amígdala lateral (AL) integra información sensorial, es donde se da la asociación de un estímulo condicionado con uno incondicionado (Mora Gallegos & Salas, 2014). La amígdala basolateral (BLA) es una región donde se da la integración de aferentes sensoriales talámicas y corticales (Wu et al., 2008). En el núcleo central de la amígdala (NCeA) es donde se encuentra la mayor cantidad de eferencias que se encargan de regular la respuesta al miedo y la ansiedad, tanto conductual como autonómica y endocrina (Mora Gallegos & Salas, 2014). La información fluye desde la AL a la BLA, antes de llegar al NCeA. Luego, las eferentes del NCeA van al gris periacueductal, tronco encefálico e

hipotálamo, que inician respuestas conductuales, autónomas y hormonales relacionadas con el miedo y la ansiedad (Figura 1) (Wu et al., 2008; Mora Gallegos & Salas, 2014). El funcionamiento normal de este circuito es fundamental para la ansiedad fisiológica, mientras que la disfunción de este circuito conducirá a la ansiedad patológica (Wu et al., 2008).

El hipocampo y la corteza prefrontal medial se conectan entre sí mediante proyecciones tanto polisinápticas (indirectas) como monosinápticas (directas) (Jin & Maren, 2015). La comunicación entre el hipocampo y la corteza prefrontal subyace tanto funciones cognitivas como comportamentales, las cuales se ven afectadas en enfermedades como los trastornos de ansiedad (Ruggiero et al., 2021).

En relación al hipocampo, está organizado en la formación hipocampal y la región parahipocampal (Witter, 2012). La formación hipocampal consta del cuerno de Amón (o hipocampo propio), el giro dentado (separados por la fisura hipocampal) y el subiculum; la región parahipocampal comprende las cortezas perirrinal, entorrinal y postrinal y el presubiculum y parasubiculum. El cuerno de Amón está dividido a su vez en tres áreas: CA1, CA2 y CA3 (Witter, 2012).

Se considera que la parte dorsal del hipocampo mediaría aspectos cognitivos (principalmente la memoria espacial) mientras que la región ventral estaría involucrada en modular procesos emocionales (Groenewegen et al., 1987; Van Groen & Wyss, 1990; Moser et al., 1993; Risold & Swanson, 1996). Además, el hipocampo también puede modular la actividad de la amígdala, estando implicado en la integración de la respuesta al miedo. Es responsable de aumentar el estado de vigilancia y atención, como también de procesar información proveniente del contexto. A su vez, el procesamiento a nivel de la amígdala del estado emocional y motivacional, puede alterar el funcionamiento del hipocampo (Mora Gallegos & Salas, 2014). En la rata, la parte ventral de CA3 y los dos tercios ventrales de CA1 reciben entradas de la amígdala (Pikkarainen et al., 1999; Pitkanen et al., 2000). Los dos tercios ventrales de CA1 también originan la mayoría de las proyecciones a la amígdala (Witter, 2012).

Respecto a la corteza prefrontal, se le ha atribuido un papel central en la regulación de procesos cognitivos, estando involucrada en el procesamiento sensorial, la planificación motora, recompensa, atención, memoria de trabajo, toma de decisiones, memoria a corto y largo plazo y el comportamiento social (Le Merre et al., 2021). Por otro lado, también se apoya la noción de que la corteza prefrontal medial regula los comportamientos emocionales dependientes de la amígdala, proporcionando una interfaz entre las estructuras límbicas y

corticales (Radley & Morrison, 2005). La corteza prefrontal es importante para la respuesta emocional aprendida, para la cual ocurre una constante retroalimentación entre ésta y la amígdala (Mora Gallegos & Salas, 2014).

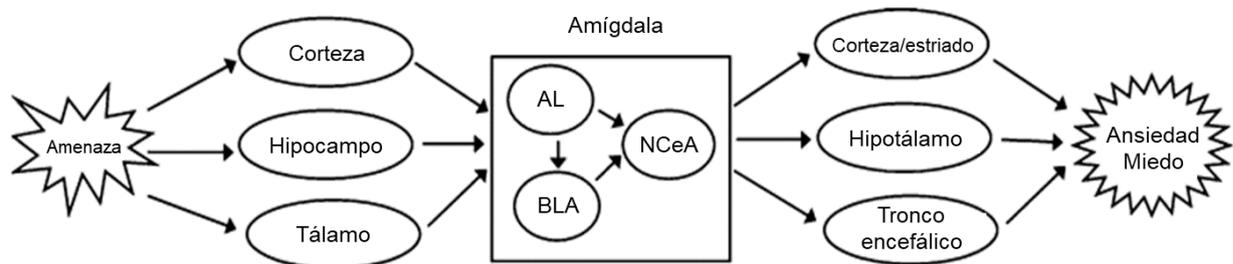


Figura 1. Diagrama del flujo de información, desde la transmisión de estímulos de amenaza hasta el inicio de conductas de ansiedad/miedo, y circuitos neuronales involucrados. Diferentes áreas del cerebro, como el tálamo, el hipocampo y la corteza detectan estímulos amenazantes. La información se transmite a la amígdala, y se integra en diferentes núcleos. La salida desde la amígdala es hacia áreas como la corteza/cuerpo estriado, el hipotálamo y el tronco encefálico. Esto inicia respuestas de miedo/ansiedad. LA, amígdala lateral; BLA, amígdala basolateral; NCeA, núcleo central de la amígdala. Tomado de Wu et al. (2008).

Estrés y diabetes mellitus

En los últimos años, la relación entre el estrés y la DM se ha vuelto bien conocida (Reagan, 2012). La DM y la hiperglicemia que la acompaña se consideran un factor de estrés endógeno crónico (Reagan, 2012). Dado que la insulina controla la captación de glucosa por parte de las células, la falta de insulina genera un estado de “inanición celular”. En las condiciones de DM, la coexistencia de la hiperglicemia y la inanición celular coexistentes puede generar estrés metabólico (Revsin et al., 2008; Reagan, 2012). Por otro lado, la desregulación del sistema neuroendocrino, en particular del eje hipotalámico-pituitario-adrenal (HPA, implicado en la respuesta fisiológica al estrés) como resultado de la DM, también está implicada en el desarrollo de trastornos conductuales como ansiedad (Gupta et al., 2014).

Como se muestra en la Figura 2, la activación del eje HPA está estrechamente relacionada con la activación del sistema nervioso simpático (SNS) del sistema nervioso autónomo (SNA), quien estimula a la médula de las glándulas adrenales a secretar catecolaminas (principalmente adrenalina y noradrenalina) (Odeón & Romera, 2017). Esta activación simpática representa la clásica respuesta de “lucha o huida” que fue caracterizada por primera vez por Walter Cannon (Ulrich-Lai & Herman, 2009). Además de la estimulación del SNA, la activación del eje HPA también estimula la liberación de la hormona liberadora de corticotropina (CRH) desde el núcleo paraventricular del hipotálamo (Herman et al., 2003). La

CRH es transportada hacia la hipófisis anterior (por el sistema sanguíneo portal hipofisario), donde estimula la liberación de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH). La ACTH, a su vez, es liberada al torrente sanguíneo para estimular la corteza adrenal, donde se sintetizan y liberan los glucocorticoides (cortisol o corticosterona en roedores) a la sangre (Johnson et al., 1992; Mormede et al., 2007). Estos glucocorticoides (GC) son los mediadores finales de la activación del eje HPA (Herman et al., 2003; Kyrou & Tsigos, 2009). Los GC se unen a dos tipos de receptores, los receptores de mineralocorticoides (MRs) y de GC (GRs) (Tilbrook & Clark, 2006), que se encuentran distribuidos diferencialmente en el cerebro, especialmente en la amígdala, el hipocampo y la corteza prefrontal, además de los órganos periféricos (Tilbrook & Clark, 2006). El aumento de los niveles de GC desencadena respuestas que aumentan la disponibilidad de energía para que el organismo pueda responder ante el agente estresor (Kyrou & Tsigos, 2009; Damián et al., 2015). Los GC ejercen, mediante retroalimentación negativa, el control de la secreción de la CRH y ACTH sobre el hipotálamo y la hipófisis respectivamente, disminuyendo de esta manera, la producción de dichas hormonas (Johnson et al., 1992; Ulrich-Lai & Herman, 2009). Los GC controlan entonces, la actividad basal del eje HPA, y son cruciales para la finalización de cada respuesta de estrés (Kyrou & Tsigos, 2009).

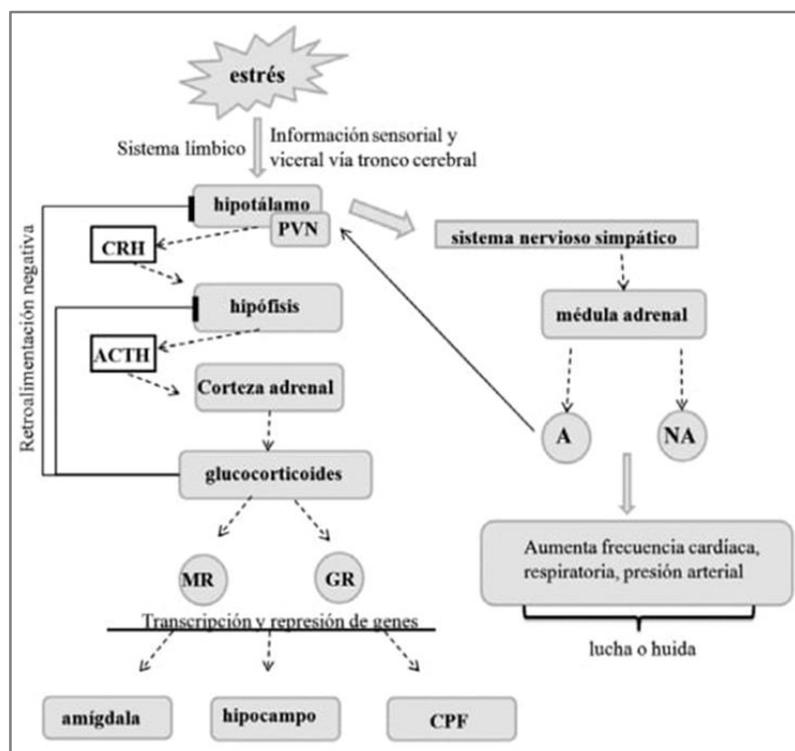


Figura 2. Estructuras anatómicas involucradas en la activación del eje hipotálamo-pituitario-adrenal en la respuesta fisiológica al estrés. A: adrenalina, NA: noradrenalina, PVN: núcleo paraventricular, CRH: hormona liberadora de corticotropina, ACTH: hormona adrenocorticotrópica, MR: receptor de mineralocorticoides, GR: receptor de GC, CPF: corteza prefrontal. Tomado de Odeón & Romera, 2017.

El hipocampo es una de las estructuras límbicas claves implicadas en la regulación del eje HPA al mediar y ser blanco de los efectos de los GC (Sapolsky et al., 1984; Radley & Morrison, 2005). En relación a lo anterior, cuando el eje HPA se activa en forma crónica, genera efectos negativos en diferentes regiones del cerebro, entre ellas se afecta la función del hipocampo (Radley & Morrison, 2005; McEwen, 2006; Stranahan et al., 2008). En este sentido, se ha reportado remodelación dendrítica de las neuronas piramidales de CA3 después de la exposición al estrés crónico, así como después de la administración de corticosterona, atrofia dendrítica en las células granulares del giro dentado y en las células piramidales de CA1, y pérdida de sinapsis en las células piramidales de CA3 en animales con estrés crónico o tratados con corticosterona (Radley & Morrison, 2005; Fuchs et al., 2006; Reagan, 2012). Los cambios en la plasticidad y función del hipocampo se revierten cuando se mantienen los niveles fisiológicos normales de corticosterona en roedores (Stranahan et al., 2008). Por otro lado, la neurogénesis adulta ocurre en regiones discretas como la zona subgranular del giro dentado del hipocampo (Altman & Das, 1965) y la zona subventricular del ventrículo lateral (Altman, 1969). Se ha reportado que la exposición a GC y diferentes estresores provocan una disminución de la neurogénesis en el giro dentado (Radley & Morrison, 2005).

La corteza prefrontal es otra región del SNC que regula la actividad del eje HPA (Radley & Morrison, 2005) y se ve afectada por el estrés o la administración de corticosterona, generando remodelación dendrítica de las neuronas piramidales en la corteza prefrontal medial y disminución de la densidad de las espinas dendríticas (Radley & Morrison, 2005; McEwen, 2006; Reagan, 2012). Similar a lo que ocurre en el hipocampo, la atrofia dendrítica en la corteza prefrontal también es reversible después de un período de recuperación sin estrés (Radley & Morrison, 2005).

La amígdala es otra región que sufre una plasticidad estructural en respuesta a un estrés crónico. Sin embargo, en esta región se observa hipertrofia y crecimiento dendrítico (Radley & Morrison, 2005; Fuchs et al., 2006; Reagan, 2012). El estrés agudo y crónico también aumenta los contactos sinápticos en la amígdala (McEwen, 2006). A diferencia de lo que ocurre en el hipocampo y la corteza prefrontal, aún persiste el aumento de la arborización dendrítica luego de un período de recuperación sin estrés (Radley & Morrison, 2005). Además, el estrés crónico promueve el miedo dependiente de la amígdala, y aumenta la agresión entre animales que viven juntos en un mismo lugar (McEwen, 2006). La plasticidad estructural inducida por el estrés en la BLA también puede estar asociada con un aumento en la frecuencia de ciertos comportamientos indicadores de ansiedad (Radley & Morrison, 2005).

La DM1 se correlaciona con una hiperactividad del eje HPA (Reagan, 2012). Pacientes con diabetes mal controlada muestran hiperactivación del eje HPA, lo que da como resultado niveles circulantes de cortisol elevados (Stranahan et al., 2008). A su vez, existe evidencia de que los niveles de corticosterona plasmática, tanto basales como bajo estrés agudo, están muy elevados en modelos roedores de DM (Beauquis et al., 2006; Stranahan et al., 2008; Reagan, 2012).

Señalización celular y diabetes mellitus

El correcto funcionamiento del cerebro depende, en parte, de una eficiente comunicación neuronal, a través del envío y procesamiento de señales (Govoni et al., 2010). Es debido a esto que las vías de transducción de señales desempeñan un papel fundamental, permitiendo que, ante múltiples entradas sensoriales, las neuronas respondan de manera coordinada y se adapten a los cambios ambientales (Govoni et al., 2010). Estímulos celulares que provocan la activación de cascadas de señalización por segundos mensajeros como el calcio (Ca^{2+}) o el adenosin monofosfato cíclico (AMPC), o por factores neurotróficos u otros, al ser transducidos por diversas vías de señalización, representan redes complejas de procesos bioquímicos, que culminan en patrones específicos de expresión de genes, los cuales están mediados por la activación o inhibición de determinados factores de transcripción (Pandey, 2004). De esta manera se altera el patrón temporal de expresión génica.

Las vías de señalización reguladas por actividad modulan la transcripción de genes al alterar la función, localización o expresión de factores de transcripción en el núcleo (West et al., 2002). Se ha demostrado que un número creciente de reguladores transcripcionales son objetivos de cascadas de señalización dependientes de la actividad en las neuronas (Lyons & West, 2011). En particular, la fosforilación transitoria de proteínas específicas es un mecanismo muy utilizado a nivel celular, la cual termina por modificar, modular o desencadenar distintas respuestas celulares, lo que implica un rol estratégico por parte de las proteínas quinasas en la comunicación neuronal (Micheau & Riedel, 1999). Desde un tiempo a esta parte, investigaciones relacionadas con las proteínas de señalización intracelular, dependientes de la actividad, están emergiendo y proporcionando nuevos conocimientos en cuanto a los mecanismos moleculares involucrados en la regulación de estados emocionales, y en particular en la ansiedad (Wu et al., 2008). Este trabajo de tesis se centra en algunas vías de señalización celular activadas de manera Ca^{2+} dependiente, a nivel del SNC, implicadas o con posible rol en la regulación del circuito de ansiedad y en condiciones de DM1. Estudiar posibles alteraciones en moléculas de señalización celular

claves podría dar evidencias de las bases moleculares de las alteraciones en el comportamiento de los ratones en el modelo de DM1 utilizado.

Calcio y calmodulina

El ion Ca^{2+} es un segundo mensajero implicado en la regulación de diversos procesos celulares (Hanson & Schulman, 1992; Dodd et al., 2010). Al ser el Ca^{2+} un ion importante para la señalización celular, la concentración de Ca^{2+} intracelular libre está estrechamente regulada, (Hanson & Schulman, 1992). Proteínas intracelulares de unión a Ca^{2+} , también conocidas como “sensores de Ca^{2+} ”, median una diversa gama de señales transitorias transducidas por Ca^{2+} (Wayman et al., 2008). Estas proteínas están presentes tanto en el citosol como el núcleo, pudiendo estar libres o unidas a las membranas. Las proteínas sensoras pueden clasificarse en transmisoras y de respuesta (Dodd et al., 2010). Dentro de las proteínas sensoras de respuesta, se encuentra la quinasa dependiente de Ca^{2+} , que combina una función sensora mediante la unión a Ca^{2+} y una actividad de respuesta mediante su actividad quinasa (Dodd et al., 2010).

Las proteínas sensoras transmisoras contienen múltiples dominios de unión al ion, y cuando esta unión se efectúa, se induce un cambio en la estructura proteica (Dodd et al., 2010). Dentro de este grupo se encuentra la proteína de 17 KDa calmodulina (CaM), la cual se encuentra muy conservada (Swulius & Waxham, 2008). Muchos de los efectos del Ca^{2+} como segundo mensajero están mediados por la CaM (Shen et al., 2005; Swulius & Waxham, 2008). Esta proteína está compuesta por lóbulos N- y C- terminales con motivo hélice-bucle-hélice, unidos por una región enlazadora helicoidal altamente flexible que permite que CaM adopte diversas conformaciones. Cada lóbulo de CaM se une a dos iones Ca^{2+} (Kovalevskaya et al., 2013). En el estado no unido a Ca^{2+} , la proteína (apo-CaM) tiene una conformación compacta, con los lóbulos cercanamente empaquetados, mientras que la unión a ion (holo-CaM) genera un cambio conformacional a un estado abierto, que lleva a que se exponga una superficie hidrofóbica en los lóbulos (Kovalevskaya et al., 2013). Esto permite la interacción y activación de un conjunto diverso de proteínas diana (Wayman et al., 2008).

Como tal, la CaM no tiene actividad enzimática, sino que su función es integrar la señal del Ca^{2+} y transducirla a otras enzimas posteriores en la vía de señalización (Swulius & Waxham, 2008). En respuesta al Ca^{2+} , muchas de las proteínas que CaM activa presentan función enzimática (Shen et al., 2005). Entre ellas se encuentran fosfatasas como la calcineurina, y quinasas, siendo una de las más caracterizadas la familia conocida como quinasas dependientes de Ca^{2+} /CaM o CaM quinasas (CaMKs): CaMKI, CaMKII, CaMKIV, CaMKK, la

quinasa de la cadena ligera de miosina (MLCK) y la fosforilasa quinasa (Hudmon & Schulman, 2002; Swulius & Waxham, 2008; Marshall et al., 2015).

Familia de las quinasas dependientes de Calcio y Calmodulina

Los miembros de la familia CaMKs se clasifican como quinasas de Serina/Treonina (Ser/Thr), debido a que los sitios diana de fosforilación en el sustrato contienen todos una Ser o una Thr (Wayman et al., 2008). Las CaMKs se pueden dividir en dos categorías: multifuncionales (CaMKK, CaMKI, CaMKII y CaMKIV) y específicas de sustrato (CaMKIII, MLCK, fosforilasa quinasa) (Swulius & Waxham, 2008). Las CaMKs multifuncionales fosforilan una amplia gama de sustratos debido a su baja especificidad y afinidad, mientras que las CaMKs específicas de sustrato presentan una especificidad muy restringida (Takemoto-Kimura et al., 2017).

Las CaMKs presentan un dominio catalítico bilobulado, seguido por un dominio regulador, dentro del cual hay un dominio autoinhibidor y un dominio de unión a CaM (Swulius & Waxham, 2008). La unión de Ca^{2+} /CaM regula el funcionamiento del dominio autoinhibidor de la siguiente manera. En condiciones basales, el dominio autoinhibidor oculta el sitio de unión al sustrato que se encuentra en el dominio catalítico. Ante un aumento de los niveles de Ca^{2+} , el complejo Ca^{2+} /CaM se une al dominio de unión a CaM, desplazando al dominio autoinhibidor del sitio de unión al sustrato que se encuentra subyacente, activándose de esta manera la enzima (Marshall et al., 2015). La activación de las CaMKs es entonces, inicialmente dependiente de la unión del complejo Ca^{2+} /CaM. Sin embargo, algunas son capaces de volverse independientes de Ca^{2+} /CaM luego de su activación, o requieren una modificación adicional (fosforilación de residuo(s) Ser/Thr en el dominio autoinhibidor o el dominio de unión a CaM), ya sea por autofosforilación o por fosforilación por otra quinasa, para lograr una activación completa (Swulius & Waxham, 2008; Marshall et al., 2015) (Figura 3).

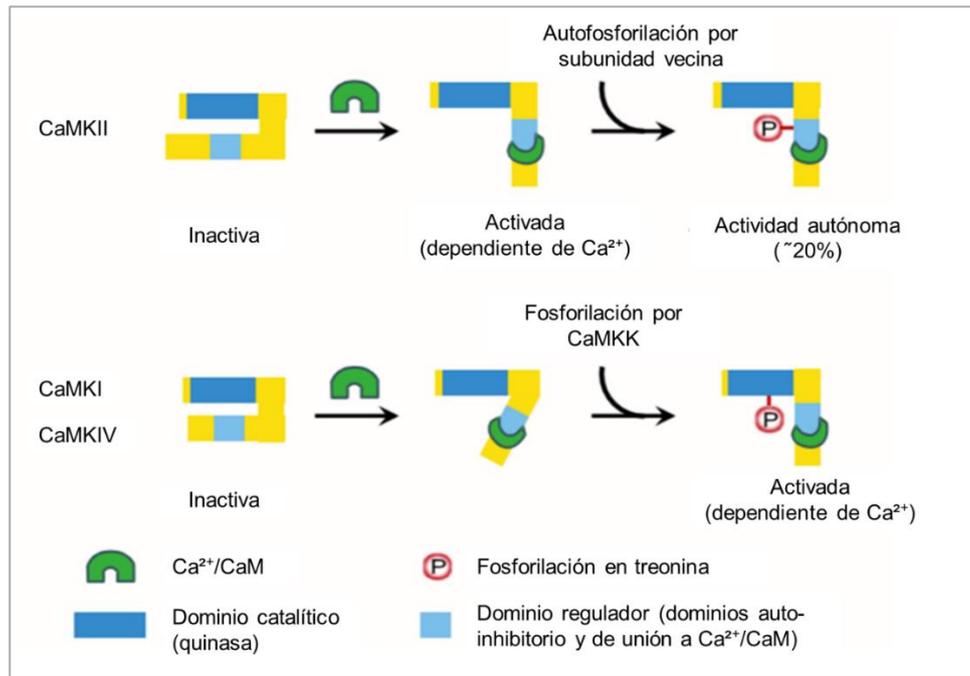


Figura 3. Dominios de CaMKII y CaMKI/CaMKIV y regulación de la actividad quinasa. Primero, el complejo Ca²⁺/CaM se une al dominio de unión a Ca²⁺/CaM, provocando que el dominio autoinhibidor que se encuentra adyacente al sitio de unión del sustrato se libere, e iniciando la activación de una holoenzima de CaMKII. La “autonomía” es inducida al activarse simultáneamente dos subunidades vecinas, y se (auto)fosforila el residuo Thr-286/287 de una subunidad. En el caso de CaMKI/CaMKIV, se activan por la unión de Ca²⁺/CaM y posterior fosforilación por parte de una quinasa corriente arriba, CaMKK, en su ciclo de activación. Tomado de Takemoto-Kimura et al., 2017.

La familia de las CaMKs está involucrada en diversas respuestas celulares, las cuales se desencadenan debido a un aumento en la concentración de Ca²⁺ intracelular (Tokumitsu et al., 1995). Entre la variedad de funciones celulares que regulan se encuentran la contracción muscular, la permeabilidad del canal iónico, liberación y síntesis de neurotransmisores, transcripción génica y síntesis de proteínas (Hudmon & Schulman, 2002). A su vez, las CaM quinasa cumplen un rol importante en la transducción de señales neuronales ya que muchos de sus sustratos están involucrados en la señalización neuronal (Hanson & Schulman, 1992). Las CaM quinasa multifuncionales son muy abundantes en el cerebro, en particular en estructuras corticales y en el hipocampo, desempeñando un papel clave en la transmisión neuronal, la plasticidad sináptica, el desarrollo de circuitos y la cognición (Hanson & Schulman, 1992; Takemoto-Kimura et al., 2017).

Algunas CaM quinasas multifuncionales

Proteína quinasa dependiente de Calcio y Calmodulina de tipo II

Se conocen cuatro isoformas de la proteína CaMKII (α , β , γ , δ), las cuales tienen un peso molecular de entre 50 y 60 kDa (Skelding et al., 2011), y están codificadas por genes independientes (Hudmon & Schulman, 2002). Las isoformas CaMKII α y CaMKII β son específicas de cerebro, representando aproximadamente el 1% de proteína total a nivel del cerebro y hasta el 2% en hipocampo (Braun & Schulman, 1995; Hudmon & Schulman, 2002). CaMKII γ y CaMKII δ se expresan en el resto de los tejidos, pero en menor proporción (Braun & Schulman, 1995; Swulius & Waxham, 2008).

Los miembros de CaMKII se asocian en oligómeros de 8 a 12 subunidades de monómeros (Colomer & Means, 2007). En su estructura, el monómero de CaMKII se compone de tres dominios diferentes: el dominio N-terminal tiene una función catalítica, y allí es donde se encuentra el sitio de unión al ATP. El dominio central presenta función reguladora; contiene una secuencia pseudosustrato que, bajo condiciones basales, une y restringe el dominio catalítico, y un sitio de unión al complejo CaM. Además, es donde se encuentran los sitios susceptibles de fosforilación (residuos de Ser/Thr que se encuentran dentro de un motivo consenso) (Braun & Schulman, 1995) y también de oxidación (residuos de Metionina (Met)) (Griffith, 2004; Takemoto-Kimura et al., 2017). El tercero es un dominio de asociación variable, cercano al extremo C-terminal, que le permite a los monómeros de CaMKII asociarse entre sí o formar diversos complejos moleculares (Griffith, 2004; Couchonnal & Anderson, 2008).

La activación de CaMKII está mediada por la unión del complejo $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ que se une al dominio regulador de la enzima (Hudmon & Schulman, 2002; Griffith, 2004), induciendo un cambio de conformación que provoca la liberación del dominio catalítico del dominio regulador, lo que permite la transferencia de un grupo fosfato a los sustratos (Lou et al., 1986). Además, el cambio conformacional deja expuesto el residuo Thr-286/287, dependiendo de la isoforma (Figura 3), cuya autofosforilación permite que CaMKII mantenga la actividad catalítica en ausencia de Ca^{2+} (Hudmon & Schulman, 2002; Griffith, 2004). De manera similar, la oxidación de los residuos de Met-281/282, previene la reasociación de los dominios catalítico y regulador incluso luego de la disociación de CaM, convirtiendo a CaMKII en una señal independiente de $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ (Hudmon & Schulman, 2002; Erickson et al., 2008). A su vez, un sitio de autofosforilación inhibitorio, Thr-306/307, se solapa con la secuencia de unión a $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$, impidiendo la unión (Colbran, 1993).

CaMKII juega un rol importante en la transducción de las señales en respuesta a cambios en la concentración del Ca^{2+} intracelular (Swulius & Waxham, 2008). Algunas de sus funciones implican la regulación de procesos como la plasticidad sináptica (Swulius & Waxham, 2008), mediando aspectos relacionados con el aprendizaje y la memoria (Takemoto-Kimura et al., 2017). CaMKII constituye la principal proteína de la densidad postsináptica en las espinas dendríticas de neuronas excitatorias, jugando un papel crítico, tanto estructural como funcional, en estos sitios de plasticidad sináptica, mediado por aumentos localizados en la concentración de Ca^{2+} (Hudmond & Schulman, 2002; Takemoto-Kimura et al., 2017). También se ha implicado un papel fundamental para CaMKII en la fase temprana de la potenciación a largo plazo (LTP, por sus siglas en inglés). La inducción de LTP en el hipocampo requiere la activación de CaMKII (Soderling, 2000). A su vez, CaMKII es una de las quinasas que fosforila al factor de transcripción CREB (proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc) en los residuos de serina (Ser) 133 y 142 (Fukunaga & Moriguchi, 2017), interacción particularmente importante para la plasticidad sináptica en las neuronas, ya que se promueve la expresión del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, por sus siglas en inglés) (Cunha et al., 2010).

Por otra parte, CaMKII ha sido implicada en la patofisiología molecular de desórdenes afectivo/emocionales (Du et al., 2004). Se ha reportado que la sobreexpresión de la isoforma α de CaMKII en el prosencéfalo, conduce a un aumento en los comportamientos de tipo ansioso (Hasegawa et al., 2009), y la exposición a un estrés agudo (único) y repetido por cuatro días, pero no crónico (14 días), aumenta los niveles de CaMKII α fosforilada (pCaMKII α) en el hipocampo, sin afectar los niveles de CaMKII total. (Suenaga et al, 2004). En contraparte, se ha reportado que la administración de diazepam, un fármaco ansiolítico que actúa como modulador del sistema GABAérgico (GABA por ácido gamma-amino butírico) (Eghbali et al., 1997; Gorman, 2002) aumenta los niveles de pCaMKII en algunas regiones del cerebro, como hipocampo y estriado (Michalak et al., 2020). De igual manera, el tratamiento crónico con antidepresivos pertenecientes al grupo de inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (5-HT) y/o norepinefrina (NE) aumenta la actividad enzimática de CaMKII, en hipocampo, debido a un aumento de la autofosforilación de CaMKII en Thr286 (Celano et al, 2003; Tiraboschi et al, 2004a). Esto sugiere que la modulación región específica de esta quinasa, podría estar vinculada a la ansiedad (Tran & Keely, 2016). Sin embargo, las inconsistencias en los trabajos reportados indican que se requiere continuar con el análisis de esta proteína en relación a cambios en el perfil comportamental.

En relación con la DM, se han encontrado escasos trabajos en los que se haya evaluado CaMKII a nivel del SNC. Se ha analizado principalmente el hipocampo en ratas con DM1

inducida con STZ, encontrando resultados inconsistentes. Algunos trabajos reportaron una reducción de pCaMKII (Liao et al., 2013; Thapak et al., 2020) y un aumento de CaMKII total en hipocampo (Liao et al., 2013). Otros no detectaron cambios en la abundancia relativa de CaMKII (Di Luca et al., 1999; Gardoni et al., 2002). Por otra parte, se vio que la presencia de CaMKII es menor en el hipocampo de un modelo de DM2 en ratones (Gao et al., 2019). Por lo tanto, es necesario continuar investigando para dilucidar si existe alguna relación entre la DM y alteraciones en CaMKII.

Proteína quinasa dependiente de Calcio y Calmodulina de tipo IV

La proteína CaMKIV presenta dos isoformas codificadas por un único gen, α y β , las cuales se expresan ambas como un monómero de 65-67 kDa (Colomer & Means, 2007; Swulius & Waxham, 2008). En su estructura, presenta una secuencia N-terminal corta, seguida del dominio catalítico, el dominio autorregulador, y un dominio C-terminal (Colomer & Means, 2007). Para su activación, CaMKIV requiere de varios pasos (Figura 3). En primer lugar, debe unirse a $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ (Anderson & Kane, 1998), ya que de esta manera se expone el bucle de activación de CaMKIV. Luego, este bucle es fosforilado por la proteína CaMKK en un residuo de Thr específico (Thr-200 en CaMKIV humano, Thr-196 en CaMKIV en ratones) (Chatila et al., 1996; Tokumitsu & Soderling, 1996; Chow et al., 2005). Sin embargo, una vez fosforilada por CaMKK, CaMKIV puede sufrir una autofosforilación de su extremo N-terminal, rico en Ser/Thr (Anderson & Kane, 1998). Este evento de autofosforilación no sólo activa al máximo CaMKIV, sino que también genera actividad independiente de $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ (Chow et al., 2005; Swulius & Waxham, 2008). Esto le permite a la quinasa retener su actividad, más allá de la duración de una elevación transitoria de Ca^{2+} (Swulius & Waxham, 2008).

La CaMKIV se encuentra principalmente en el SNC (Sakagami et al., 1992; Ho et al., 2000; Song et al., 2013). Se expresa en niveles elevados en las neuronas, donde generalmente exhibe una localización nuclear, pudiendo también estar presente en el citosol (Jensen et al., 1991; Nakamura et al., 1995; Song et al., 2013).

La CaMKIV es de particular interés en la señalización neuronal del Ca^{2+} debido a su función como activador transcripcional (Ho et al., 2000). Se transloca entre el citoplasma y el núcleo en respuesta a estímulos celulares que generan un aumento del Ca^{2+} intracelular (Bito et al., 1996; Colomer & Means, 2007). Implicada en el aprendizaje y la memoria, así como el comportamiento emocional (Kasahara et al., 2001; Moriguchi et al., 2015), esta quinasa fosforila y activa otras proteínas involucradas en la regulación transcripcional, como la familia CREB de factores de transcripción (CREB, y el factor de transcripción activador-1 o ATF-1);

el factor de respuesta sérica (SRF); los coactivadores CBP (proteína de unión a CREB) y P300, la sinapsina I, la proteína relacionada a Ras Rap1-b, la adenilil ciclasa neuronal de tipo I, y la oncoproteína-18 (Anderson & Kane, 1998) y en la regulación de la expresión de genes neuronales (Kasahara et al., 2001; Bito et al., 1996).

Individuos que presentan síntomas de ansiedad son tratados con diferentes psicofármacos, entre ellos la fluoxetina, un inhibidor selectivo de la recaptación de 5-HT (ISRS). En este sentido, se ha reportado que el tratamiento con fluoxetina incrementa CaMKIV en algunas regiones del cerebro en individuos sanos (Tiraboschi et al., 2004b). Por lo tanto, hay indicios de que exista un vínculo entre una disminución de CaMKIV y el comportamiento de ansiedad y estrés manifestado en individuos diabéticos. Sin embargo, de acuerdo a nuestro conocimiento no existen trabajos que hayan evaluado si CaMKIV se ve afectada en diferentes regiones del cerebro en modelos animales de DM y si está relacionada con cambios a nivel comportamental en situaciones de estrés o ansiedad. A su vez, muy pocos trabajos han analizado la distribución de esta proteína en ratones sanos (Arrázola et al., 2009; Moriguchi et al., 2014; Tang et al., 2021), y no hemos encontrado trabajos donde se analice en modelos animales de DM.

Proteína de unión al elemento de respuesta a AMP cíclico

El factor de transcripción CREB es una proteína de 46 kDa localizada a nivel nuclear. CREB pertenece a una familia de factores de transcripción que forman homo- y heterodímeros gracias a una serie de residuos de leucina, y se une al ADN mediante aminoácidos básicos adyacentes (Shaywitz & Greenberg, 1999). Es capaz de ser activado por diversas vías metabólicas, entre las cuales se encuentran la proteína quinasa A (PKA), la proteína activada por mitógenos/quinasas regulada por señales extracelulares (MAPK/ERKs por sus siglas en inglés), y CaMKs como CaMKI, CaMKII o CaMKV (Sheng et al., 1991; Shaywitz & Greenberg, 1999; Mayr & Montminy, 2001). Al ser activado, CREB es fosforilado (pCREB), se une a otro pCREB o a otros factores de transcripción de la familia CREB, como CREM (modulador del elemento de respuesta a AMPc) o ATF-1 (Lonze and Ginty, 2002). Forman un dímero, el cual se une al elemento de respuesta a AMPc (CRE por sus siglas en inglés) por un dominio de tipo cremallera de leucina, y posteriormente puede reclutar otras proteínas co-activadoras como la CBP, p300, y la ARN polimerasa II (Pol II) (Johannessen et al., 2004; Carlezon et al., 2005; Chrivia et al., 1993; Kwok et al 1994), promoviendo la transcripción de genes como *c-fos*, *Arc*, *Zif268 (Egr-1)* y *Bdnf* (Tao et al., 1998; Shaywitz & Greenberg, 1999; Lonze & Ginty, 2002; Mantamadiotis et al., 2002). Se cree que son más de 100 los genes diana sobre los que actúa este factor de transcripción (Lonze & Ginty, 2002), los cuales están involucrados

en la neurotransmisión, la estructura celular, la transducción de señales, la transcripción y el metabolismo (Mayr & Montminy, 2001), así como la supervivencia celular, el aprendizaje y la memoria, y el comportamiento emocional (Wu et al., 2008; Moriguchi et al., 2015).

Respecto a la fosforilación de CREB, CaMKIV fosforila a CREB a nivel del residuo Ser-133, mientras que CaMKII lo hace en Ser-133 y en un sitio adicional, que es Ser-142 (Sun et al 1994). Se sugiere que los efectos de esta fosforilación adicional podrían ser la activación de diferentes programas de expresión génica (Blendy, 2006), o la inhibición de la actividad transcripcional de CREB (Sun et al., 1994). Una vez fosforilado, la actividad de CREB se mantiene durante 2 a 4 horas, siendo posteriormente desfosforilado por las fosfatasas de Ser/Thr PP1 y PP2 (Hagiwara et al., 1992; Wadzinski et al., 1993).

Alteraciones en la abundancia de CREB o de su estado fosforilado han sido implicadas en trastornos afectivo/emocionales como ansiedad o depresión, en una condición no diabética, y a su vez, se ha reportado que el tratamiento con ansiolíticos o antidepresivos revierte esta alteración. Por ejemplo, ratones deficientes de CREB mostraron un aumento en los comportamientos de tipo ansioso evaluados en pruebas como el Laberinto Elevado en Cruz (*Elevated Plus Maze*, EPM) y el Campo Abierto (*Open Field*, OF) (Valverde et al., 2004). Por otro lado, algunos trabajos detectaron un aumento de la relación pCREB/CREB en el hipocampo y la corteza prefrontal de roedores tratados con fluoxetina, respecto a aquellos sanos no tratados (Tiraboschi et al., 2004b, Kong et al., 2009; Tardito et al., 2009). A su vez, Song et al. (2013) encontraron que la fosforilación de CREB fue menor en ratones deficientes de CaMKIV tratados con fluoxetina.

Factor neurotrófico derivado del cerebro

La neurotrofina BDNF es una proteína que se sintetiza inicialmente como un precursor, la proteína pre-proBDNF, la cual, luego de ser clivada, resulta en la proteína proBDNF de 32 kDa. ProBDNF también es clivada proteolíticamente por enzimas intracelulares como la furina o proconvertasas, y se secreta como la proteína BDNF madura (mBDNF) de 14 kDa. También puede primero ser secretada como proBDNF y posteriormente clivada por proteasas extracelulares, como la plasmina o metaloproteinasas, para dar mBDNF (Lessmann et al., 2003).

La proteína BDNF se expresa en las células del cerebro y médula espinal (Nakagomi et al., 2015; Yang et al., 2018). Es esencial para el mantenimiento de las funciones neuronales, incluyendo la plasticidad sináptica y desempeña, además, un rol clave en procesos

fisiológicos y morfológicos relacionados con el aprendizaje y la memoria, así como en los trastornos de estados emocionales (Thoenen, 1995; Figurov et al., 1996; Nitta et al., 2002; Shin et al., 2019). BDNF actúa sobre el receptor TrkB, activando de esta manera distintas vías de señalización involucradas en diversos procesos celulares que no sólo regulan la neurogénesis promoviendo el crecimiento y la proliferación, sino que también regulan la apoptosis y sobrevivencia neuronal, por lo que su ausencia es nociva para el correcto funcionamiento del cerebro (Thoenen, 1995; Figurov et al., 1996; Nitta et al., 2002; Shin et al., 2019).

Se ha reportado que la exposición aguda o crónica al estrés en animales no diabéticos disminuye la cantidad relativa de BDNF en el hipocampo (Smith et al., 1995; Duman & Monteggia, 2006), mientras que la aumenta en el hipotálamo (Liu et al., 2020). Además, los niveles de BDNF en el hipocampo se ven disminuidos en pacientes adultos con depresión (Nestler et al., 2002). De hecho, la administración crónica de diferentes clases de antidepresivos aumenta BDNF en hipocampo y corteza prefrontal (Duman et al., 1997; Duman et al., 2000; Andero et al., 2014). A su vez, tratamientos antidepresivos bloquean la regulación a la baja de BDNF provocada por el estrés (Duman, 2002). En relación a lo anterior, Chen et al. (2001) analizaron por inmunohistoquímica la proteína BDNF en muestras postmortem de hipocampo de pacientes con trastornos psiquiátricos, y encontraron un aumento en los niveles de esta neurotrofina en aquellos que habían sido tratados con antidepresivos.

El perfil comportamental de los animales diabéticos también podría estar relacionado con alteraciones en estas moléculas de señalización celular. Sin embargo, se han reportado pocos trabajos que las analicen en modelos animales de DM. Algunos trabajos muestran una disminución en los niveles proteicos o de ARN mensajero de BDNF y CREB, así como en los niveles de pCREB en modelos de DM en ratones, en diferentes regiones del cerebro vinculadas con la ansiedad, principalmente en la corteza prefrontal, o el hipocampo, o de BDNF en el hipotálamo (Stranahan et al., 2011; Wang et al., 2016; Patel et al., 2018; Tang et al., 2018; Zborowski et al., 2019; Wu et al., 2020). Se han reportado resultados similares en modelos de DM en ratas (Nitta et al., 2002; Kumar et al., 2010; Ma et al., 2011; Datusalia & Sharma, 2014; Ripoli et al., 2020; Thapak et al., 2020). Sin embargo, no se ha evaluado CREB en la amígdala o el hipotálamo de modelos animales de DM.

Hipótesis

El perfil comportamental de tipo ansioso en el modelo murino de DM1 inducida por STZ se acompaña de cambios en la inmunodetección de CaMKII, CaMKIV, CREB, pCREB_(Ser-133) y BDNF en diferentes regiones del cerebro que están implicadas en la regulación de la ansiedad.

Objetivos

Objetivo general

Determinar si ratones inyectados con STZ presentan comportamientos de tipo ansioso y muestran alteraciones en la abundancia relativa de proteínas de señalización celular (CaMKII, CaMKIV, CREB y su estado fosforilado pCREB_(Ser-133), y BDNF) en diferentes regiones del cerebro vinculadas con la ansiedad, comparado con ratones no diabéticos.

Objetivos específicos

Comparar entre ratones inyectados con STZ y ratones control:

- Variables fisiológicas: glicemia y peso corporal.
- Parámetros comportamentales medidos en pruebas de ansiedad: prueba de Campo Abierto (OF) y Laberinto Elevado en Cruz (EPM).
- Abundancia relativa de las proteínas CaMKII, CaMKIV, CREB pCREB_(Ser-133), y BDNF en homogeneizados de muestras de hipocampo, amígdala, corteza frontal-prefrontal e hipotálamo, mediante Western blot.
- Distribución de la proteína CaMKIV en cortes histológicos de hipocampo, mediante inmunofluorescencia y Microscopía Láser Confocal.

Materiales y métodos

El protocolo de experimentación fue aprobado por el Comité de Ética en el Uso de Animales (CEUA-IIBCE, Ministerio de Educación y Cultura, Uruguay, número de protocolo: 004/11/2020) de acuerdo con la legislación nacional. El trabajo fue realizado en el Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE), y en el Institut Pasteur Montevideo, Montevideo, Uruguay.

Mantenimiento de animales

Se utilizaron 24 ratones macho de la especie *Mus musculus* de la cepa CD1, los cuales fueron mantenidos en un ambiente controlado a $22 \pm 2^\circ\text{C}$, en un ciclo de 12 horas luz/oscuridad (horas de luz de 7:00 am a 7:00 pm), con libre acceso a alimento balanceado y agua. Los ratones fueron destetados a los 21 días de edad y agrupados de a cuatro a seis animales por caja.

Inducción de diabetes y determinación de glicemia y peso corporal

Como se muestra en la Figura 4, la DM1 fue inducida en los ratones a los 45 días de edad ($n= 12$) mediante una única inyección intraperitoneal de STZ (150 mg/5 mL/kg, en 0.1 mM buffer citrato salino, pH 4.5, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). La STZ genera necrosis selectiva en las células β del páncreas, productoras de insulina, ocasionando un estado de hiperglicemia crónico por ausencia de insulina. Este modelo de inducción de DM1 por administración de STZ ya ha sido usado y validado en el laboratorio (Benech et al., 2014; Damián et al., 2014). El grupo control (GC, $n= 12$) fue inyectado solamente con buffer citrato salino (vehículo). Previo a la inyección de STZ o buffer citrato, los niveles de glicemia se encontraron dentro del rango normal en todos los animales. Las muestras de sangre fueron obtenidas de la vena de la cola durante un estado de no ayuno, y para medir la glicemia se utilizó el dispositivo *Accu-Chek Active system* (Roche, Mannheim, Germany). Luego de la inyección de STZ o buffer, y de manera semanal, se verificaron los niveles de glicemia hasta la confirmación de la DM. Aquellos ratones que mostraron niveles de glicemia mayores a 250 mg/dL fueron considerados diabéticos (GD: grupo diabético). A partir de la confirmación de la DM (aproximadamente 15 días luego de la inyección de STZ), los animales se mantuvieron sin ningún tratamiento durante 90 días. Los niveles de glicemia también fueron registrados al momento de la eutanasia, donde se detectó que un 91,4% de los ratones inyectados con STZ tuvo hiperglicemia, mientras que un 93,8% de los animales control mantuvo niveles de

glicemia por debajo de 250 mg/dL. Aquellos animales que no se encontraron dentro del rango de glicemia esperado para cada grupo, no fueron utilizados para los procedimientos posteriores. El dispositivo de medición de glicemia tiene un límite máximo de detección de 600 mg/dL. Aquellos animales inyectados con STZ que, al momento de medir la glicemia, superaron dicho límite, se les consideró como medición el valor máximo de detección. El peso corporal fue medido y registrado mensualmente, desde el día de la inyección hasta la eutanasia.

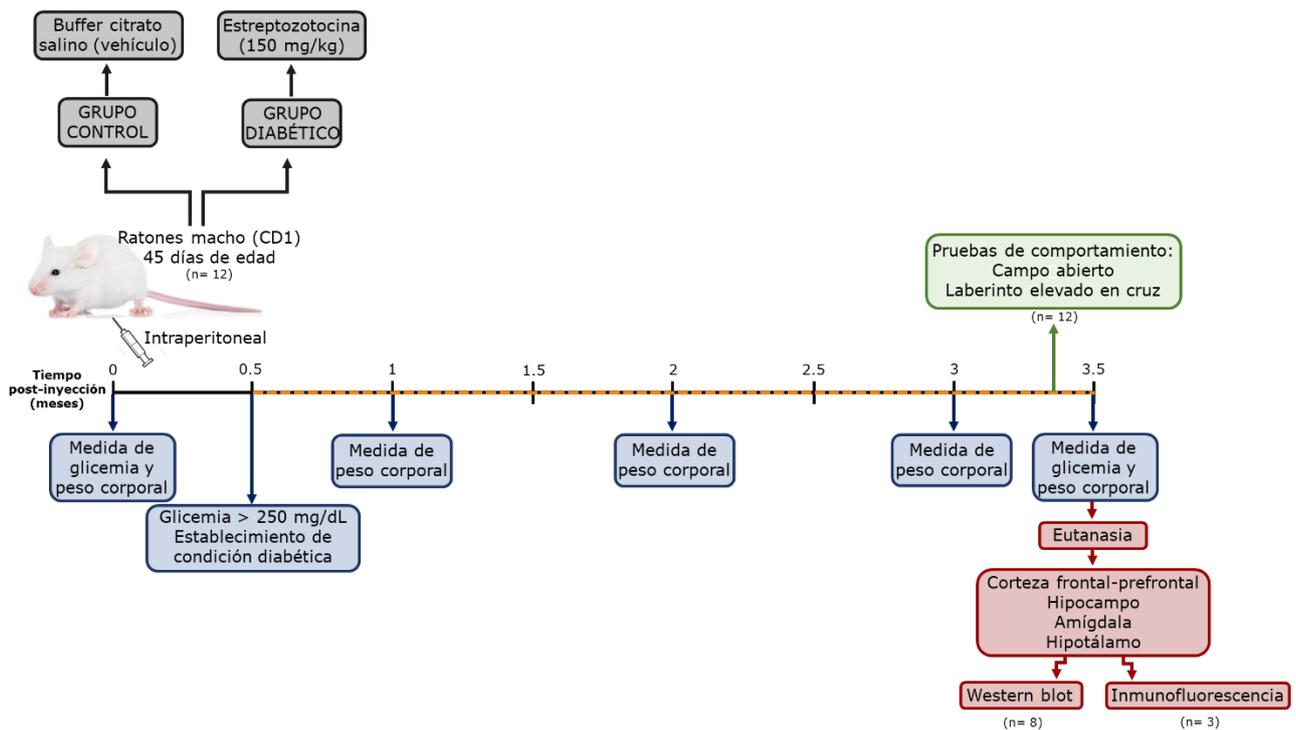


Figura 4. Línea temporal de protocolo experimental. La línea punteada amarilla indica el tiempo en el que se considera que los animales mantuvieron la condición diabética modelo (por inducción con STZ), desde el momento de la constatación de la hiperglicemia y hasta la eutanasia (3 meses), sin ningún tratamiento antidiabético.

Pruebas de comportamiento

Los animales fueron llevados a la sala de experimentación dos horas antes de realizar las pruebas de comportamiento para permitir que se aclimaten al ambiente. El cuarto experimental se mantuvo a una temperatura controlada de $22 \pm 2^\circ\text{C}$. Unos 3-4 días previo a la eutanasia (cercano a que se cumplieran 90 días desde la confirmación de la DM), se realizaron las pruebas OF y EPM a los animales de ambos grupos. El EPM se realizó dos días luego del OF, de acuerdo con Damián et al. (2014; 2021). Ambas pruebas de

comportamiento se realizaron en horas de luz (entre las 9:00 y las 12:00 hs), y fueron registradas utilizando una cámara Sony HD para análisis posteriores.

Prueba de Campo Abierto

Una de las pruebas más utilizadas para evaluar cambios en el perfil comportamental en modelos animales, relacionados con la ansiedad, es el OF (Sestakova et al., 2013). El OF ha sido ampliamente utilizado en los experimentos de Hall (1934, 1936), quien fue el primero en desarrollarlos y describirlos para estudiar el comportamiento en situaciones de estrés del aislamiento social, en un ambiente novedoso e inevitable, en donde se pueden observar comportamientos de tipo ansioso en roedores (ratas y ratones) (Suarez & Gallup, 1981; Prut & Belzung, 2003). El OF consiste en una jaula cuadrada de plexiglás (35 x 35 x 40 cm) con paredes para minimizar la luz y el ruido exterior. Los animales se colocaron individualmente en el centro del OF y se les permitió mover libremente durante un período de 10 minutos. Los comportamientos medidos fueron frecuencia y tiempo haciendo *grooming* y *freezing*, frecuencia de *rearings* y defecaciones, que se describen en la Tabla 2 y Figura 5. La información de locomoción fue registrada automáticamente por una cámara conectada a una computadora equipada con el software EthoVision XT 7.0 (Noldus, Wageningen, The Netherlands), e incluyó los siguientes parámetros: distancia recorrida (cm), tiempo (s) de permanencia en la zona central (región de 12 x 12 cm) respecto al punto central (PC; centro/PC), y en la periferia (región de 5 cm en el margen exterior de la caja) respecto al PC (periferia/PC), y velocidad media (cm/s) Luego de la monitorización del comportamiento, el OF se limpió con una solución de etanol al 70% y se dejó secar entre cada animal.

Prueba de Laberinto Elevado en Cruz

Otra prueba comportamental muy utilizada es EPM (Sestakova et al., 2013). En esta prueba, la evitación de los espacios abiertos y el comportamiento exploratorio de los roedores, genera un conflicto que subyace la necesidad del animal de explorar el entorno desconocido en contraposición a su peligro potencial (Pellow et al., 1985; Mora Gallegos & Salas, 2014). El EPM consiste en dos brazos abiertos (BA; 30 x 5 cm) y dos brazos cerrados (BC; 30 x 5 cm, con paredes de 15 cm de altura) que se encuentran extendidos en forma de cruz, desde una plataforma central. El aparato, hecho de madera, se encontraba elevado 40 cm del suelo. Los ratones se colocaron en la plataforma central del EPM (5 x 5 cm), mirando hacia un brazo cerrado y se les permitió explorar el laberinto durante 5 minutos. Los parámetros comportamentales medidos fueron frecuencia de entradas y tiempo en BC y BA, y el número de entradas a los BA en relación al número total de entradas a ambos brazos (BA/BT), así

como a las entradas a los BC (BA/BC). Además, se midió la frecuencia de *grooming*, *rearing* y *freezing*, y las defecaciones.

Tabla 2. Lista de comportamientos evaluados en las pruebas de comportamiento.

Comportamiento	Descripción
Grooming	El animal se acicala su piel o cola con su boca o sus miembros anteriores.
Freezing	El animal permanece inmóvil, con tensión muscular evidente.
Rearing	El animal se para con sus miembros posteriores sin tocar las paredes de la caja, o se apoya contra las paredes con sus miembros anteriores.
Defecación	Bolos fecales producidos.

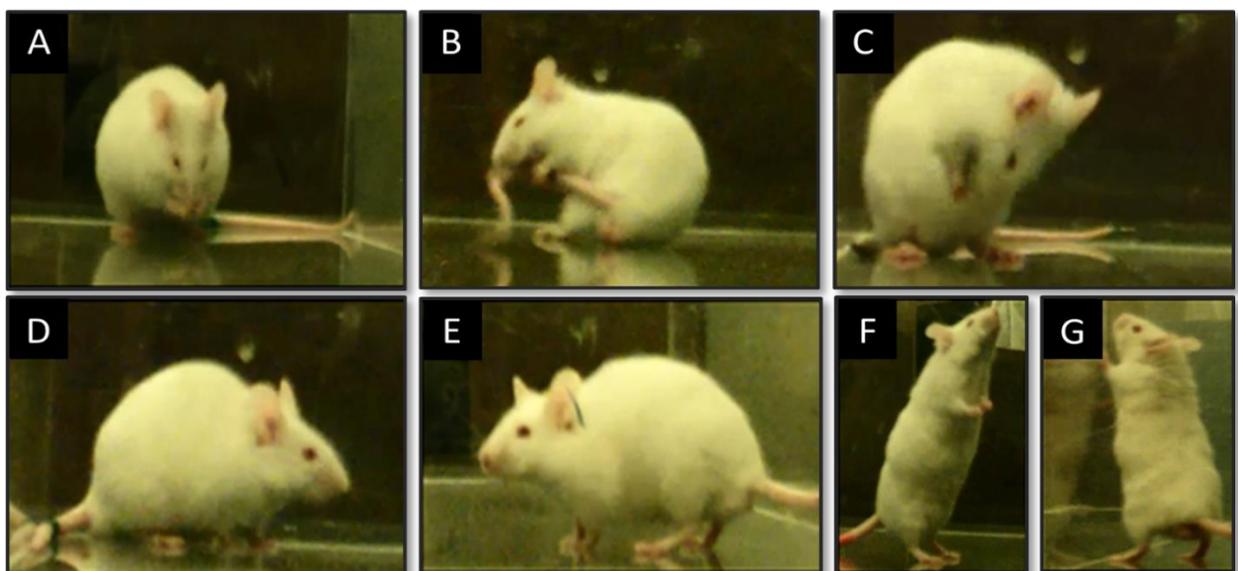


Figura 5. Comportamientos evaluados en pruebas de Campo Abierto y Laberinto Elevado en Cruz. En el comportamiento de *grooming* (A, B y C), los ratones se acicalan la nariz/cara (movimientos a lo largo del hocico), su cabeza (movimientos semicirculares sobre la parte superior de su cabeza y detrás de las orejas) y su cola; realizan el aseo del cuerpo lamiendo el pelaje del cuerpo, ya sea con su boca o con sus patas delanteras. El *freezing* (D y E), se caracteriza por una postura agazapada, sin movimiento, excepto para el movimiento respiratorio. El *rearing* (F y G), consiste en el animal apoyándose en ambas patas traseras en posición vertical. Imágenes propias.

Obtención de muestras

Luego de 90 días desde la confirmación de la DM (3-4 días post-pruebas de comportamiento), se realizó la eutanasia de los ratones por dislocación cervical. Las muestras de cerebro fueron congeladas a -80°C directamente luego de extraídas. Al momento de su utilización, se procedió a realizar la disección con bisturí de las diferentes regiones a analizar: hipocampo,

amígdala, corteza frontal-prefrontal e hipotálamo. Para obtener dichas muestras se utilizaron como guía el atlas de anatomía e histología comparada de Treuting et al. (2017), y el atlas estereotáxico Paxinos & Franklin (2001). Para la obtención de amígdala e hipotálamo (regiones demarcadas en figura 6B y C), se extrajo tejido de la parte ventral del cerebro en la región marcada entre los planos 4 y 5 de la Figura 6A. Para extraer el hipocampo, se introdujo una espátula debajo del corpus callosum y la corteza, para remover el tejido que se encontraba sobre el hipocampo (tálamo, *septum* y *striatum* subyacente). El hipocampo visible fue removido con espátula (Figura 6B) y separado del resto de tejido. La corteza frontal-prefrontal fue obtenida extrayendo tejido desde bregma 2,8 mm a bregma -0,34 mm, como se muestra en los esquemas de las Figuras 6D y E,

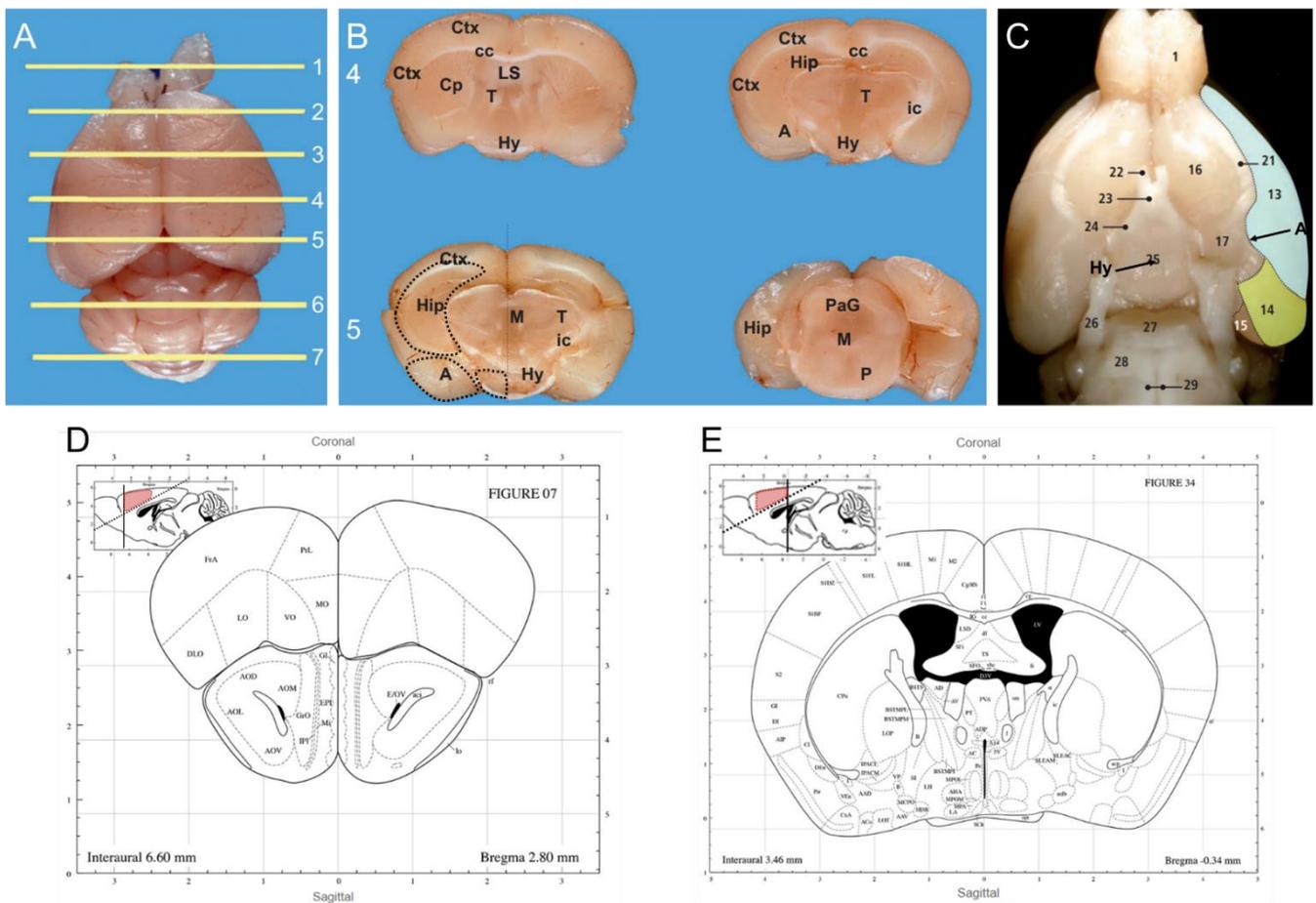


Figura 6. (A) Vista dorsal de cerebro de ratón. (B) Imágenes de cortes coronales de cerebro de ratón en planos 4 y 5 (indicados en A) donde se muestran las regiones utilizadas para análisis por Western blot: amígdala, hipocampo e hipotálamo. (C) Vista ventral de cerebro de ratón. Flechas indican las regiones amígdala e hipotálamo. (D) y (E) Esquemas de corte coronal en bregma 2,8 mm y -0.34 mm, respectivamente. En esquina superior izquierda de ambos esquemas se indica coloreada región de corteza frontal-prefrontal utilizada para análisis por Western Blot. Abreviaturas: A, amígdala; Hip, hipocampo; Hy, hipotálamo. Imágenes A y B tomadas de Treuting et al., 2017. Imagen C tomada de Ruberte et al., 2017. Imágenes D y E tomadas de Paxinos & Franklin, 2001.

Homogeneizados

Para que ocurra la liberación del contenido celular y solubilizar las proteínas, se realizaron homogeneizados en homogenizadores de vidrio de 500 μ L (*Kimble Chase, USA*), en una relación de 1 g de tejido/10 mL buffer de lisis (Tris 20 mM, NaCl 150 mM, Triton X-100 2%, glicerol 10%, SDS 0.1%, EGTA 1 mM, NaF 10 mM, PMSF 1 mM, ortovanadato de sodio 1 mM, beta-glicerol fosfato 50 mM y *cocktail* inhibidor de proteasas 1X (*SIGMA-ALDRICH Co, St Louis, MO, USA*)). Las muestras fueron centrifugadas durante 10 minutos a 15000 g. Finalmente, el sobrenadante fue sonificado 2 veces por 3 segundos a % *duty cycle 40* y *output control - micro tip limit 4* (*Ultrasonic Homogenizer 4710 Series, Cole Parmer Instrument Co, Chicago, IL, USA*).

Cuantificación de proteínas totales

La concentración de proteínas totales fue determinada por el ensayo de Bradford (1976). Para esto se realizó una curva de calibración con distintas concentraciones conocidas de albúmina sérica bovina (BSA) a partir de una solución stock de concentración 0.1 mg/mL. Para cada uno de los homogeneizados se realizó una dilución 1/1000. Tanto a las muestras de la curva de calibración como a las diluciones de las muestras de concentración a determinar, se les agregó 200 μ L de reactivo de Bradford, completando un volumen final de 1 mL con agua miliQ. Se dejó reaccionar mínimo 5 minutos y se midió la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro UV-V -ZUZI MOD. 4418/2. A partir de la ecuación de la recta, y luego de multiplicar por el factor de dilución correspondiente, se obtuvo un valor promedio de concentración proteica para cada muestra.

SDS-PAGE

Se añadió a las muestras buffer Laemmli 5x (Tris 0,3125 M, SDS 10%, β -mercaptoetanol 25%, glicerol 50%, azul de bromofenol 0.1%), las cuales luego fueron calentadas a 95°C por 5 minutos. Se sembraron 50 μ g de proteínas totales de cada una de las muestras (controles y diabéticos, n= 6-8 de cada condición) en geles de poliacrilamida al 10%. Como referencia de los pesos moleculares se utilizó el marcador estándar de peso molecular *Precision Plus Protein WesternC Standards* (161-0376, *Bio-Rad Laboratories, Inc*). Se realizó una electroforesis desnaturante y en condiciones reductoras, a 30 mA en cubas de electroforesis *Bio-Rad* (*Bio-Rad Laboratories, Inc, Hércules, CA, USA*). El buffer de corrida contiene: Tris 25 mM, glicina 190 mM, SDS 0.1%.

Western blot

Luego de ser corridas por SDS-PAGE, las proteínas fueron transferidas a membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF), a la cual previamente se la trató con metanol por 5 minutos, y luego con buffer de transferencia por 10 minutos. Se armó el “sándwich” sumergido en buffer de transferencia, en orden de polo negativo a polo positivo: esponja/papel de filtro/gel/membrana/papel de filtro/esponja, evitando que queden burbujas entre el gel y la membrana. Se colocó en el dispositivo, y se transfirió 1 hora y 15 minutos a 4°C y 400 mA. El buffer de transferencia contiene: Tris 25 mM, glicina 190 mM, SDS 0.1%, metanol 20%.

Las membranas fueron bloqueadas con leche descremada al 5% en buffer Tris salino 1x con Tween 0.2% (TBS-T) por 30 min a temperatura ambiente (TA) y en agitación. Las membranas fueron posteriormente incubadas *overnight* a 4°C y en agitación con anticuerpos anti BDNF (1:2000 dil., ab226843, Abcam), CREB (1:500 dil., ab31387, Abcam), pCREB (S133, 1:500 dil., ab32096, Abcam), CaMKIV (1:2000 dil., 4032, Cell Signaling), CaMKII (pan, 1:750 dil., 3362, Cell Signaling) o GAPDH (1:15000 dil., ab181602, Abcam) en TBS-Tween 0.2% + BSA 2%. Las membranas fueron lavadas con TBS-Tween 0.2% y luego incubadas con el anticuerpo secundario anti-rabbit HRP (1:5000 dil., A0545, Sigma Aldrich) o anti-rabbit Alexa Fluor488 (1:2000 dil., Ab150077, Abcam) en TBS-Tween 0.2% durante 1 hora a temperatura ambiente (TA) y en agitación. Se realizaron lavados con TBS-T de 10 minutos entre cada paso, a TA y en agitación. La señal se desarrolló utilizando *SuperSignal West Pico Plus Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific, USA)* y se detectaron las bandas por quimioluminiscencia para el caso de las membranas incubadas con el anticuerpo secundario anti-rabbit HRP. Aquellas membranas incubadas con el anticuerpo secundario anti-rabbit Alexa Fluor488, las bandas se detectaron excitando a 488 nm con el dispositivo *High Performance Luminescent Image Analyser (FLA-9000 Fujifilm)*. Se realizó como control negativo, la incubación solamente con anticuerpo secundario de una membrana a la cual se había realizado la transferencia de las proteínas desde el gel. La cuantificación de las bandas fue llevada a cabo por densitometría utilizando el programa *Image J (NIH, USA)*. Los valores obtenidos fueron normalizados con los del control de carga GAPDH (excepto el correspondiente a pCREB que fue comparado en relación a CREB total), y expresados en unidades arbitrarias (UA). El GAPDH ya ha sido utilizado en otros trabajos como control de carga, donde se ha reportado que la cantidad de dicha enzima no se ve afectada por la DM (Jung et al., 2010; Patel et al., 2018; Yuan et al., 2019; Liu et al., 2020). A su vez, se realizó una normalización entre membranas, ya que todas las muestras sembradas fueron normalizadas en función de una muestra control.

Cortes histológicos e inmunofluorescencia

Las muestras de cerebro fueron conservadas en PFA 10% a 4°C hasta su utilización. Se realizaron cortes coronales de 30 µm de grosor (n= 3 de cada condición) en vibrátomo (de caudal a rostral, bregma -2.8 mm a bregma -1.9 mm según Paxinos & Franklin, 2001.), a los cuales se les realizaron lavados con glicina 100 mM en PBS 1x. Los cortes fueron permeabilizados con Tritón X-100 0.3% en PBS 1X por 24 hs a 4 °C en agitación. Posteriormente fueron bloqueados con BSA 1% + glicina 100 mM en PBS 1x a TA en agitación. Luego se incubaron con el anticuerpo primario anti CaMKIV (1:100 dil., C2851, Sigma) *overnight* a 4 °C y en agitación. Luego de realizar lavados con PBS 1x, se incubó con el anticuerpo secundario Dylight 650 (1:200 dil., ab96922, Abcam) + DAPI 1 µg/mL, durante 1 hora a TA en agitación. Se realizaron lavados con PBS 1x y se montaron los preparados. Se llevó a cabo un control negativo incubando sólo con anticuerpo secundario.

Microscopía Láser Confocal

Las imágenes fueron adquiridas con objetivos 20x (aire; AN=0,5), excitando la muestra a la longitud de onda de 640 nm para la detección de CaMKIV y a 405 nm para detectar DAPI, mediante el Microscopio Láser Confocal ZEISS modelo LSM 800 – AiryScan con cámara de Epifluorescencia Color 506. Se utilizaron 3 animales de cada condición (GC y GD). Se realizaron *stacks* de imágenes en el plano z cada 2 µm, y a su vez se llevó a cabo una reconstrucción del hipocampo realizando un *tile scan*, el cual fue analizado en 3 cortes de cada muestra. Las imágenes fueron obtenidas teniendo en cuenta aplicar la misma exposición para cada una de las capturas (obtenido en base al *background* observado en el control negativo). Se llevó a cabo una aproximación preliminar, realizando un análisis descriptivo de la localización de CaMKIV en las distintas regiones del hipocampo, comparando entre los animales del GD y el GC (3 animales de cada grupo). Como guía se utilizó el Atlas Allen de cerebro de ratón del *Allen Institute for Brain Science* disponible en <https://mouse.brain-map.org>.

Análisis estadístico

Los parámetros comportamentales y la cuantificación de proteínas que no seguían una distribución normal fueron comparados entre los ratones pertenecientes al GC y GD utilizando el test U de Mann–Whitney. Aquellos que sí seguían una distribución normal, así como la glicemia, fueron comparados utilizando el test t de Student para datos no pareados. El peso corporal fue analizado con un ANOVA para muestras repetidas utilizando el procedimiento

PROC MIXED de SAS (*SAS University Edition*). El modelo estadístico incluyó el grupo (GC o GD), el tiempo (meses), y la interacción entre grupo y tiempo como efectos fijos. Los ratones de cada grupo fueron considerados como un efecto aleatorio. Comparaciones post hoc fueron realizadas por el test de Tukey. Los datos fueron expresados como la media \pm error estándar de la media (EEM) o como la mediana y el rango intercuartílico. Los resultados fueron considerados significativos con un $\alpha \leq 0,05$ y se consideró tendencia con $0,05 > \alpha \leq 0,1$.

Resultados

VARIABLES FISIOLÓGICAS

Glicemia

Transcurridos 90 días luego de que la hiperglicemia había sido confirmada, el GD presentó niveles de glicemia mayores a 250 mg/dL, los cuales fueron significativamente diferentes al GC (GD: $593,9 \pm 4,5$ mg/dL vs. GC: $143,1 \pm 6,4$ mg/dL; $T_{(12, 12)} = 57,67$; $P < 0,0001$) (Figura 7A).

Peso corporal

Hubo un efecto significativo de grupo ($F_{(1, 10)} = 8,49$; $P = 0,016$) e interacción entre grupo y tiempo ($F_{(4, 39)} = 3,21$; $P = 0,02$) en el peso corporal (Figura 7B). Al comienzo del experimento todos los ratones registraron un peso corporal similar. Sin embargo, a lo largo de los meses se detectó que los ratones pertenecientes al GD tuvieron un menor aumento en el peso corporal que los ratones del GC, como se evidencia a los meses 3 y 3,5 luego de comenzar el experimento. El peso corporal de todos los animales cambió a lo largo del tiempo ($F_{(4, 39)} = 10,25$; $P < 0,0001$), el cual aumentó desde el mes 0 al 3 ($P < 0,0001$), manteniéndose sin diferencias entre los meses 3 y 3,5 (Figura 7B).

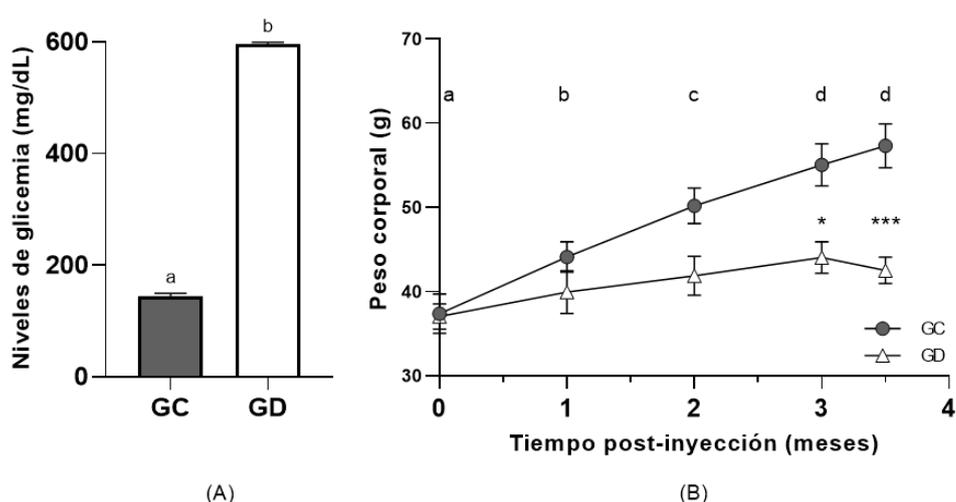


Figura 7. (A) Niveles de glicemia (mg/dL, media \pm EEM) al momento de la eutanasia de los animales inyectados con vehículo (GC: grupo control; $n = 12$) o STZ (GD: grupo diabético; $n = 12$). Diferentes letras entre grupos indican diferencias significativas ($P < 0,0001$). (B) Peso corporal (g, media \pm EEM) en el GC y GD a lo largo del tiempo post-inyección (meses). Tiempo 0 es el día de la inyección de STZ (GD) o vehículo (GC). Diferentes letras entre meses indican diferencias significativas ($P < 0,001$). Asteriscos indican diferencias entre el GD y el GC en el mismo tiempo (meses): * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$.

Parámetros de comportamiento

Prueba de Campo Abierto

La distancia recorrida ($T_{(11, 12)} = 0,631$; $P = 0,535$), la velocidad media ($T_{(11, 12)} = 0,631$; $P = 0,535$), así como el tiempo de permanencia en la zona central ($U_{(11, 12)} = 53$; $P = 0,449$) y zona periférica ($T_{(11, 12)} = 0,909$; $P = 0,374$) no mostraron diferencias entre grupos (Figura 8A, B, C, D, respectivamente). Los animales del GD tuvieron una menor frecuencia de *grooming* ($T_{(12, 12)} = 2,448$; $P = 0,02$; Figura 8G) y tendieron a tener una mayor frecuencia de *freezing* respecto al GC ($T_{(12, 12)} = 1,674$; $P = 0,1$; Figura 8I). Sin embargo, no hubo diferencias entre grupos en la frecuencia de *rearing* ($T_{(12, 12)} = 0,151$; $P = 0,881$; Figura 8H). Se detectó una tendencia a estar menos tiempo haciendo *grooming* ($T_{(12, 12)} = 1,952$; $P = 0,06$; Figura 8E) y más tiempo haciendo *freezing* ($U_{(12, 12)} = 42$; $P = 0,08$; Figura 8F) en el GD respecto al GC. No se evidenciaron diferencias significativas en el número de defecaciones realizadas entre los GD y GC ($T_{(12, 12)} = 0,230$; $P = 0,820$; Figura 10A).

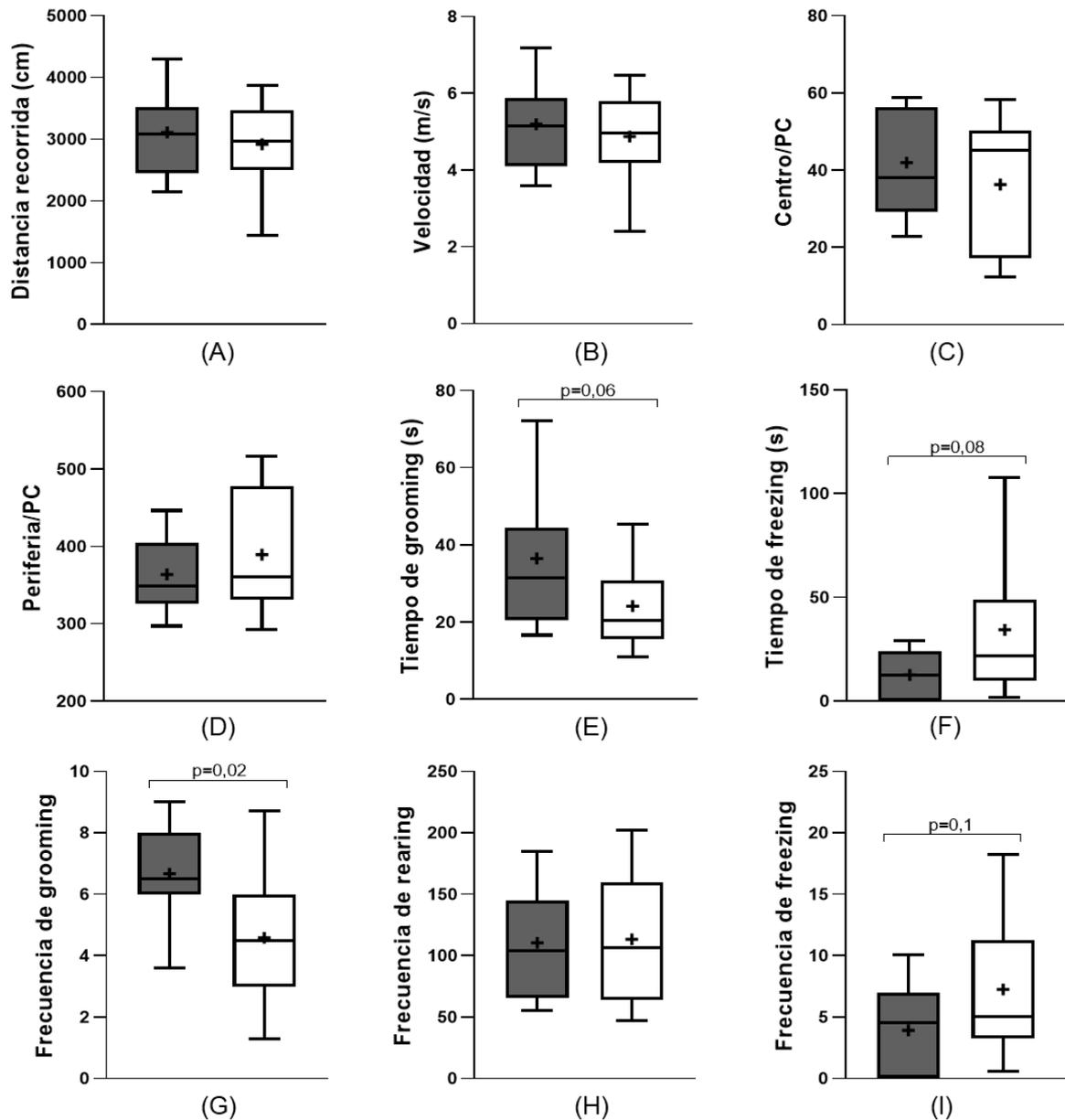


Figura 8. Parámetros medidos durante la prueba de Campo Abierto: distancia recorrida (A), velocidad (B), tiempo de permanencia (s) en la zona central (centro/PC) (C), y la zona periférica (periferia/PC) (D), tiempo haciendo *grooming* (E), y *freezing* (F), y frecuencia de *grooming* (G), *rearing* (H) y *freezing* (I) se muestran como *box plot* (cada *box* representa el percentil 25–75, y la línea horizontal que atraviesa el *box* es la mediana: el percentil 50, y las líneas que se extienden abajo y arriba de cada *box* representan el percentil 10 y 90 indicando el rango de datos; + representa la media) en ratones control (GC: barras grises; n= 12) y diabético (GD: barras blancas; n= 12).

Prueba de Laberinto Elevado en Cruz

El tiempo de permanencia y la frecuencia de entradas a los BA fueron significativamente menores en el GD en relación al GC ($U_{(12, 12)} = 29$; $P = 0,01$ y $U = 36$; $P = 0,03$, respectivamente;

Figura 9A y B). Los animales pertenecientes al GD tendieron a pasar más tiempo en los BC en comparación con los del GC ($T_{(12, 12)}= 2,011$; $P= 0,06$; Figura 9C). Sin embargo, no se encontraron diferencias en la frecuencia de entradas a los BC ($T_{(12, 12)}= 0,170$; $P= 0,866$; Figura 9D). Tampoco se encontraron diferencias en el número total de entradas a ambos brazos (brazos totales o BT= BA+BC) entre el GD y el GC ($T_{(12,12)}= 0,979$; $P= 0,338$; Figura 9E). Los ratones del GD tuvieron una mayor frecuencia en el número de entradas a los BA en relación a BT (BA/BT) respecto a los ratones del GC ($T_{(12, 12)}= 3,119$; $P= 0,005$; Figura 9F), así como en el número de entradas a los BA en relación a los BC (BA/BC) respecto al GC ($T_{(12,12)}= 3,074$; $P= 0,006$; Figura 9G). No se encontraron diferencias entre grupos en la frecuencia de *grooming* ($T_{(12, 11)}= 1,008$; $P= 0,325$; Figura 9H), *rearing* ($U_{(12, 12)}= 64$; $P= 0,659$; Figura 9I) o *freezing* ($U_{(8,8)}= 29,50$; $P> 0,999$; Figura 9J). No se evidenciaron diferencias significativas en el número de defecaciones realizadas entre los GD y GC ($U_{(12, 9)}= 13$; $P= 0,849$; Figura 10B).

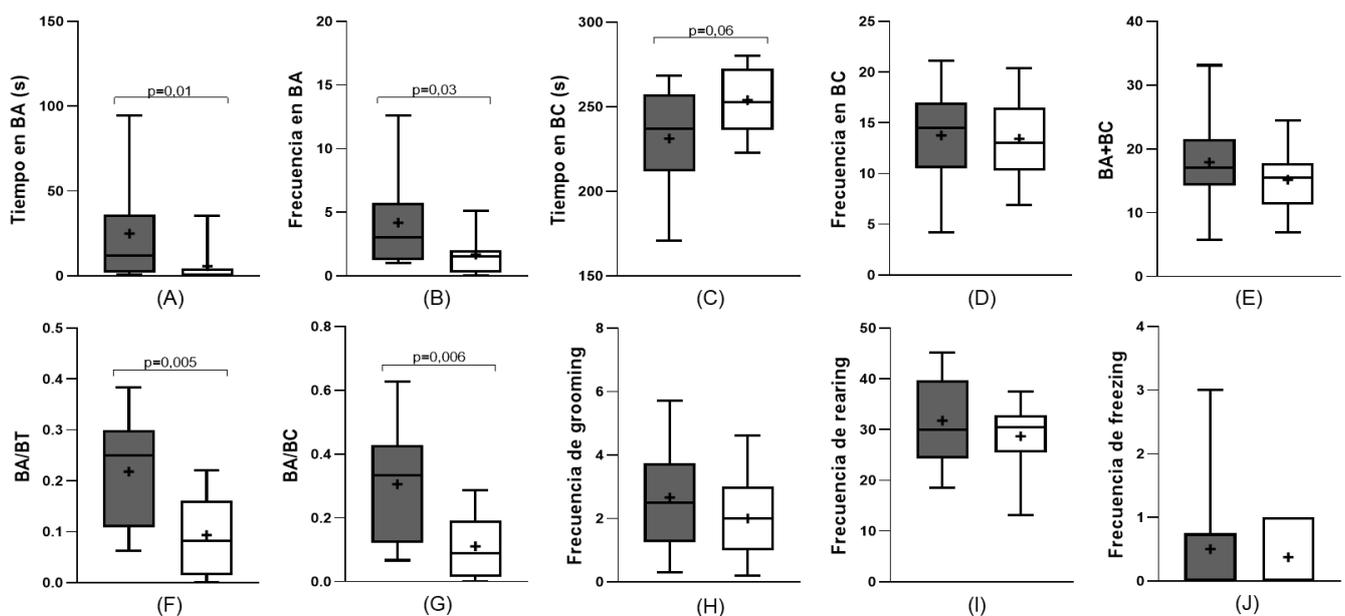


Figura 9. Tiempo de permanencia y frecuencia de entradas a los brazos abiertos (BA; A y B, respectivamente) y brazos cerrados (BC; C y D, respectivamente), total de entradas a BA y BC (BT= BA+BC; E), número de entradas a los BA en relación al número total de entradas a ambos brazos (BA/BT; F), número de entradas a los BA en relación a las entradas a los BC (BA/BC; G), y frecuencia de *grooming* (H), *rearing* (I) y *freezing* (J) medido en la prueba de Laberinto Elevado en Cruz se muestran como *box plot* (cada *box* representa el percentil 25–75, y la línea horizontal que atraviesa el *box* es la mediana: percentil 50, y las líneas que se extienden debajo y arriba de cada *box* representan el percentil 10 y 90 indicando el rango de datos; + representa la media) en ratones del grupo control (GC: barras grises; n= 12) y diabético (GD: barras blancas; n= 12).

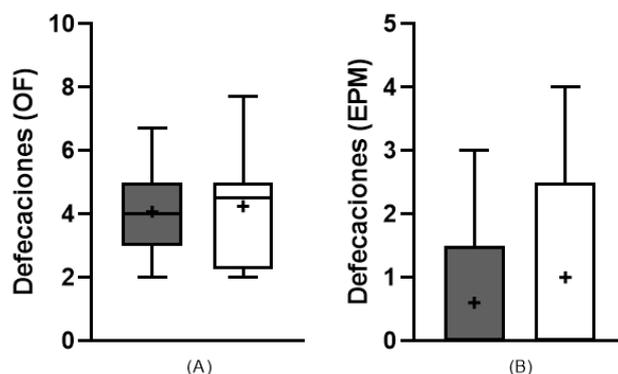


Figura 10. Número de defecaciones realizadas en pruebas de Campo Abierto (A; OF: *Open Field*) y Laberinto Elevado en Cruz (B; EPM: *Elevated Plus Maze*): se muestran como box plot (cada box representa el percentil 25–75, y la línea horizontal que atraviesa el box es la mediana: percentil 50, y las líneas que se extienden debajo y arriba de cada box representan el percentil 10 y 90 indicando el rango de datos; + representa la media) en ratones del grupo control (GC: barras grises; n= 12) y diabético (GD: barras blancas, n= 12).

Determinación de proteínas de señalización

Inmunodetección de proteínas en el hipocampo

La cantidad relativa de CaMKIV hipocampal fue menor en los ratones del GD en comparación a los del GC ($U_{(6, 8)} = 5$; $P = 0,01$; Figura 11A). Sin embargo, no se encontraron diferencias en la abundancia relativa de CaMKII α ($U_{(4, 7)} = 0,9$; $P = 0,412$), CaMKII β ($U_{(4, 7)} = 14$; $P > 0,9999$), CREB ($T_{(6, 8)} = 0,9599$; $P = 0,356$), pCREB/CREB ($T_{(5, 8)} = 0,691$; $P = 0,504$) o BDNF ($T_{(6, 8)} = 0,730$; $P = 0,479$) entre grupos en esta región (Figura 11A y C).

Inmunodetección de proteínas en la amígdala

Respecto a la amígdala (Figura 11B y D), solamente se encontraron diferencias en la cantidad relativa de CREB, la cual fue mayor en los ratones del GD en comparación con ratones del GC ($T_{(7, 8)} = 2,591$; $P = 0,02$). La presencia de CaMKII α ($T_{(7, 4)} = 1,028$; $P = 0,331$), CaMKII β ($T_{(7, 4)} = 0,231$; $P = 0,823$), CaMKIV ($U_{(7, 8)} = 20$; $P = 0,397$), CaMKII ($T = 0,189$; $P = 0,854$), pCREB/CREB ($T_{(7, 6)} = 1,543$; $P = 0,151$) y BDNF ($T_{(8, 8)} = 0,772$; $P = 0,453$) no mostraron diferencias entre grupos.

Immunodetección de proteínas en la corteza frontal-prefrontal

En la corteza frontal-prefrontal (Figura 12A y C) no se encontraron diferencias entre grupos en la cantidad relativa de CaMKII α ($T= 0,457$; $P= 0,656$), CaMKIV ($U_{(7, 8)}= 26$; $P= 0,867$), CaMKII β ($T_{(8, 6)}= 0,309$; $P= 0,762$), CREB ($T_{(7, 8)}=1,346$; $P= 0,201$), pCREB/CREB ($T_{(7, 8)}=1,048$; $P= 0,314$), ni BDNF ($T_{(7, 8)}= 0,467$; $P= 0,648$). No se detectaron bandas en el peso molecular correspondiente a CaMKII β .

Immunodetección de proteínas en el hipotálamo

Un aumento en la abundancia relativa de CREB ($T_{(7, 8)}= 3,532$; $P= 0,004$) y una disminución de la relación pCREB/CREB ($T_{(7, 8)}= 2,414$; $P= 0,03$) se encontró en el hipotálamo de los ratones pertenecientes al GD (Figura 12B y D), así como una tendencia a aumentar la cantidad relativa de BDNF respecto al GC ($T_{(7, 8)}= 1,843$; $P= 0,09$). No se encontraron diferencias entre grupos en la presencia de CaMKII α ($T_{(7, 6)}= 0,1562$; $P= 0,879$) o CaMKIV ($U_{(7, 8)}= 24$; $P= 0,694$) en dicha región. No se detectaron bandas en el peso molecular correspondiente a CaMKII β .

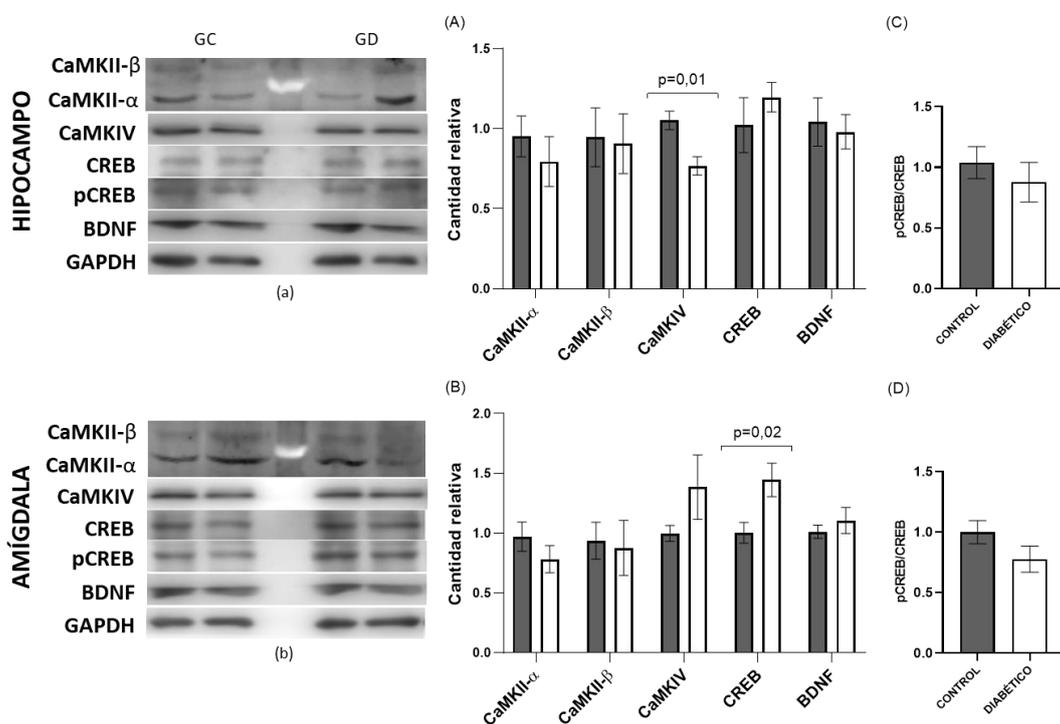


Figura 11. Imágenes representativas de Western blots en hipocampo (a) y amígdala (b) de ratones inyectados con STZ luego de 90 días de hiperglicemia sin tratamiento (GD: grupo diabético), o vehículo (GC: grupo control). Immunodetección de proteínas (media \pm EEM) en hipocampo (A) y amígdala (B) del GD (barras blancas) o GC (barras grises). $n= 6-8$ de cada condición. La cantidad de las proteínas fue cuantificada en relación a GAPDH, excepto para pCREB que fue cuantificado en relación a CREB total.

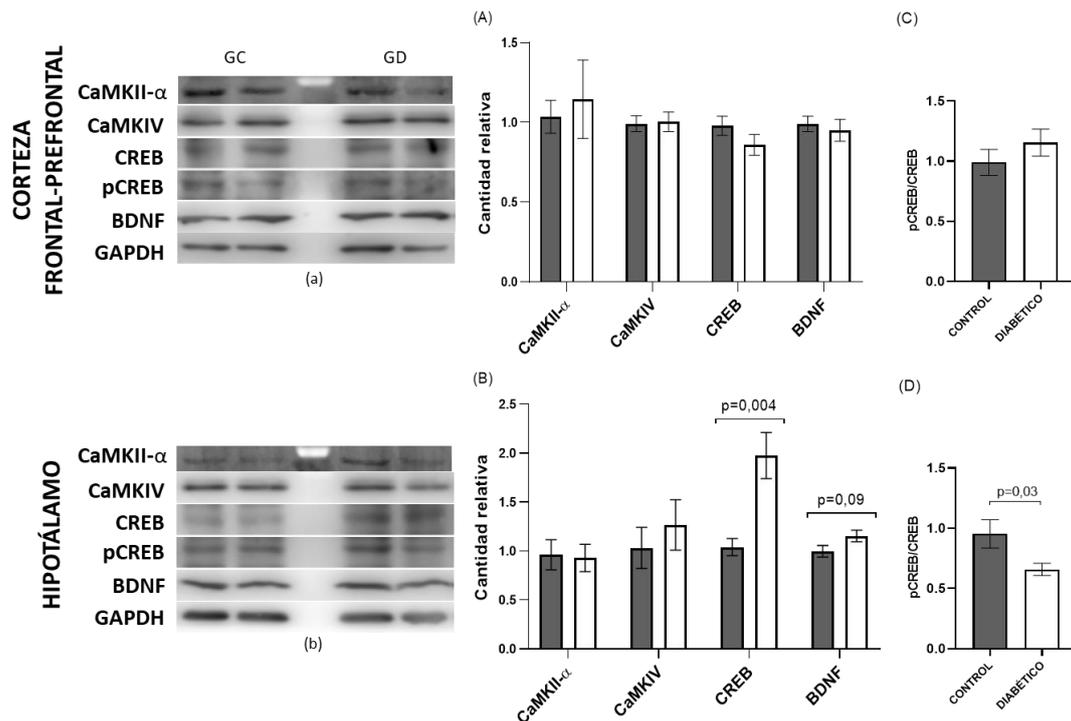


Figura 12. Imágenes representativas de Western blots en corteza frontal-prefrontal (a) e hipotálamo (b) de ratones inyectados con STZ luego de 90 días de hiperglicemia sin tratamiento (GD: grupo diabético), o vehículo (GC: grupo control). Inmunodetección de proteínas (media \pm EEM) en corteza frontal-prefrontal (A) e hipotálamo (B) del GD (barras blancas) o CG (barras grises). $n = 6-8$ de cada condición. La cantidad de las proteínas fue cuantificada en relación a GAPDH, excepto para pCREB que fue cuantificado en relación a CREB total.

Microscopía Láser Confocal

En la Figura 13 se muestran imágenes representativas de la reconstrucción del hipocampo por el método de *tile scan*, a partir de la herramienta *tile scan* del Microscopio Láser Confocal, a un aumento de 20x. Se pudo apreciar en ambos grupos, señal de CaMKIV localizada a nivel de CA1, CA3 y el giro dentado. Sin embargo, en los controles la marca de fluorescencia se notó más restringida al borde interno (superficie basal) de la hoja inferior de la capa de células granulares en el giro dentado (Figuras 13 y 14), y en la fisura hipocampal (Figuras 13 y 15), mientras que en los diabéticos se vio una señal distribuída más uniformemente. En ambos grupos, la señal de fluorescencia pareció ser mayormente perinuclear (Figuras 14 y 15).

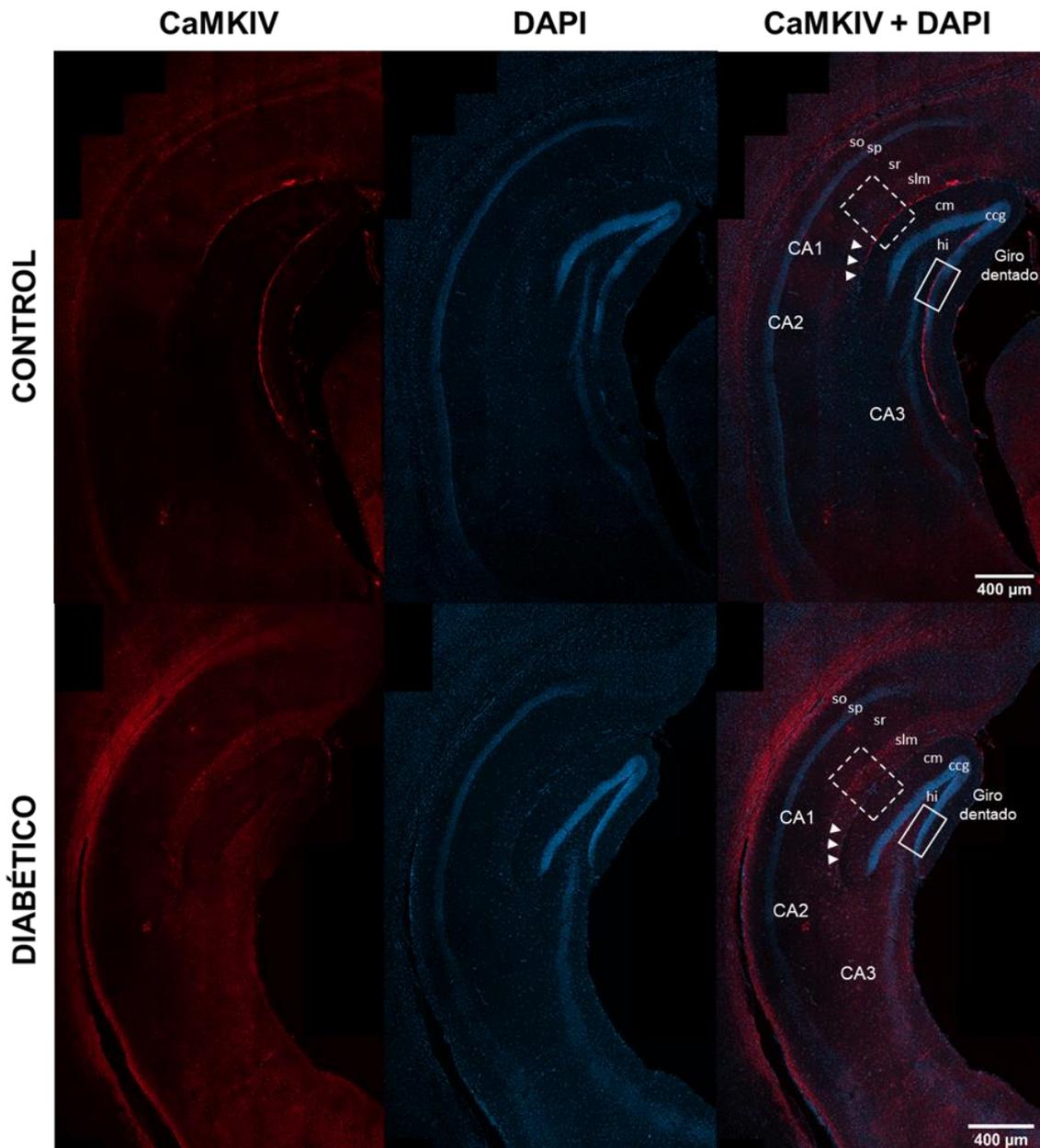


Figura 13. Imágenes representativas de método *tile scan* de inmunofluorescencia realizada en cortes histológicos de hipocampo provenientes de ratones controles (superior) y diabéticos (inferior) incubados con anticuerpo anti-CaMKIV (n= 3 de cada condición). Aumento 20x. Abreviaturas: so, *stratum oriens*; sp, *stratum pyramidale*; sr, *stratum radiatum*; slm, *stratum lacunosum-moleculare*; cm, capa molecular; hi, *hilus*; ccg, capa de células granulares. Puntas de flecha indican fisura hipocámpal. Recuadro con línea continua mostrado con aumento en figura 14; recuadro con línea discontinua mostrado con aumento en figura 15.

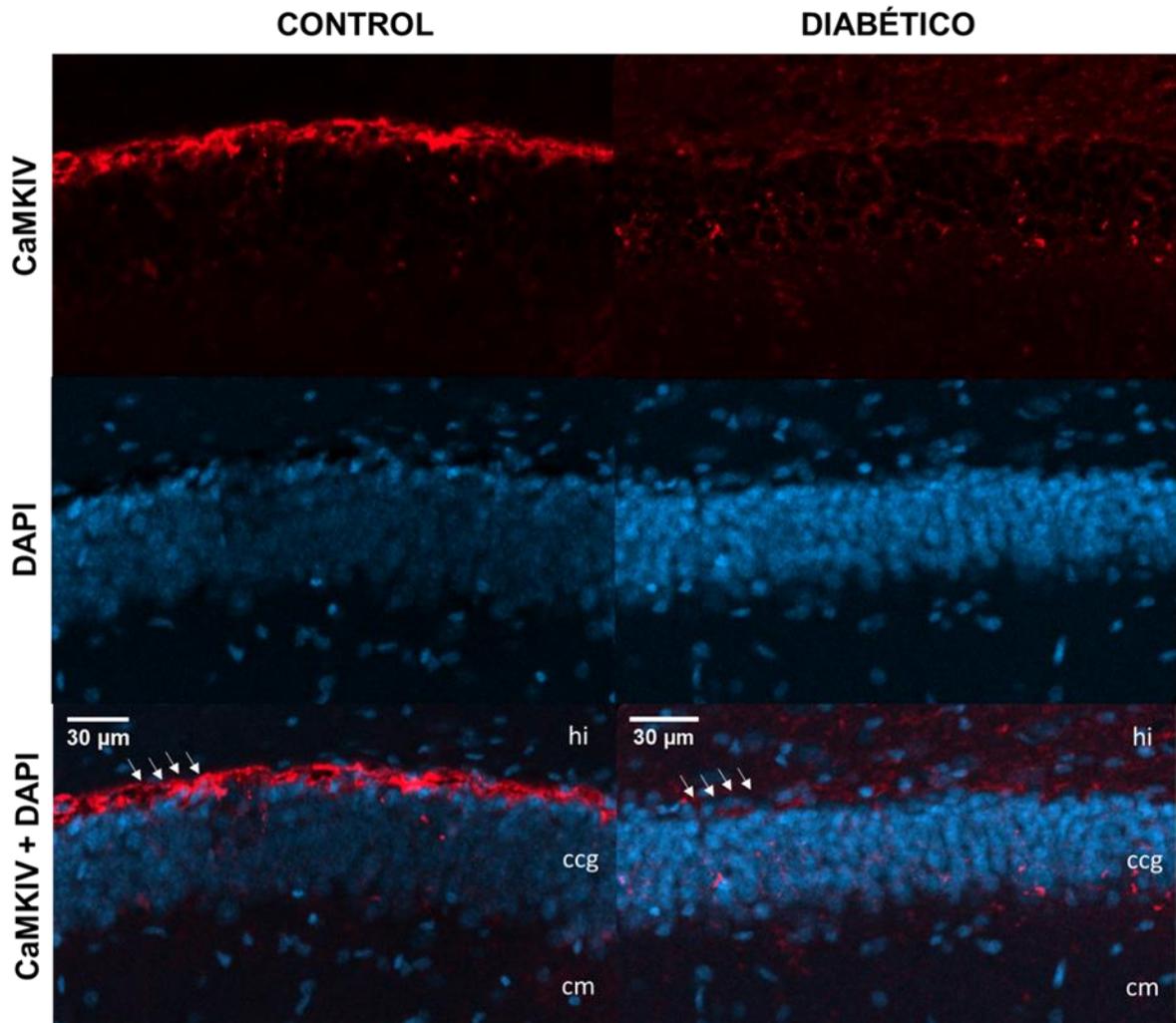


Figura 14. Imagen aumentada de recuadro con línea continua en región del giro dentado en controles (izquierda) y diabéticos (derecha) incubados con anticuerpo anti-CaMKIV. Aumento 20x. Abreviaturas: hi, *hilus*; cm, capa molecular; ccg, capa de células granulares. Flechas indican superficie basal de capa de células granulares.

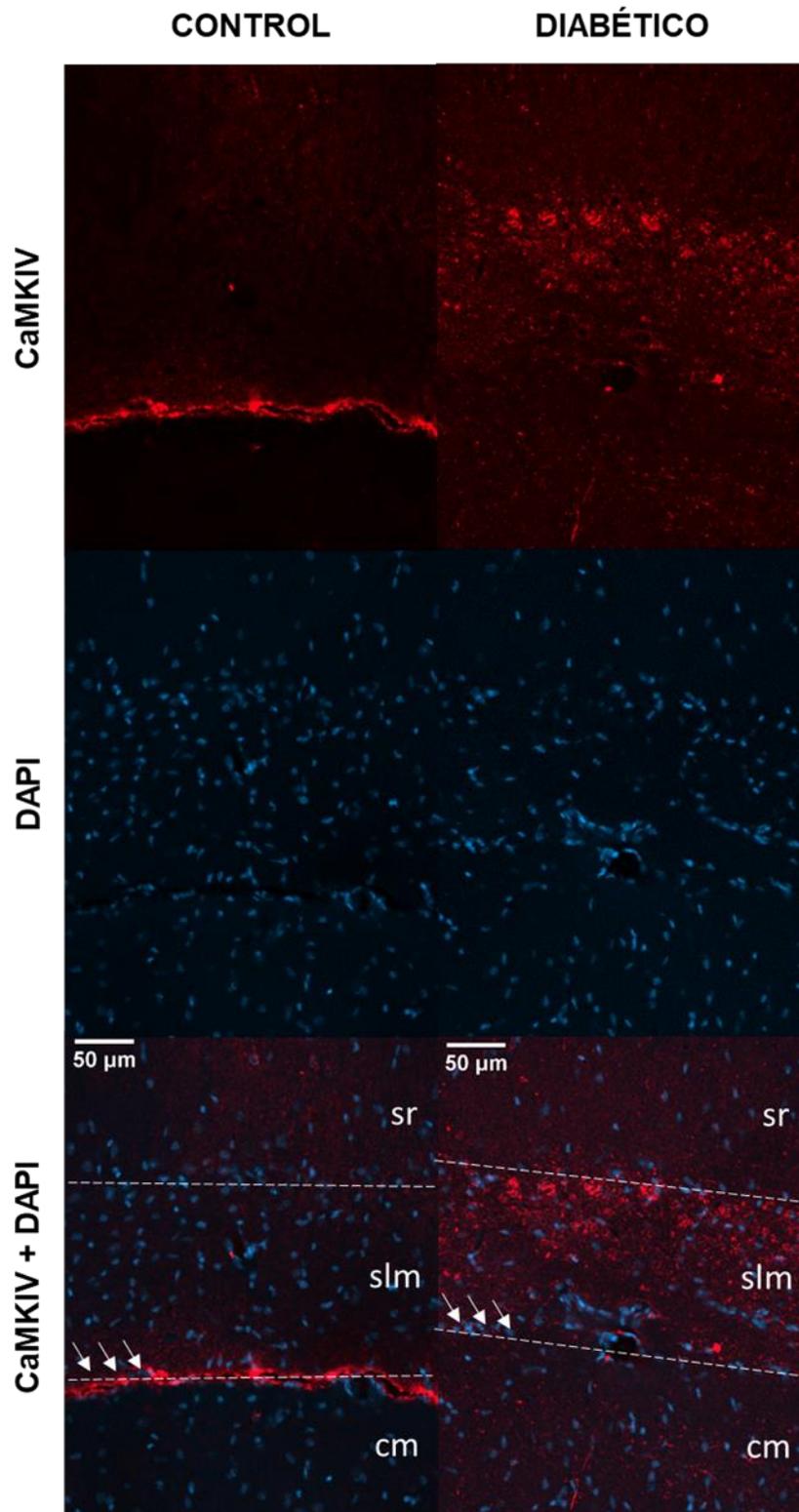


Figura 15. Imagen aumentada de recuadro con línea discontinua en región que rodea el *stratum lacunosum-moleculare* de CA1 en controles (izquierda) y diabéticos (derecha) incubados con anticuerpo anti-CaMKIV. Aumento 20x. Abreviaturas: sr, *stratum radiatum*; slm, *stratum lacunosum-moleculare*; cm, capa molecular. Flechas indican fisura hipocampal.

Discusión

En esta tesis se reafirma el perfil comportamental, verificándose que los animales inyectados con STZ presentan comportamientos de tipo ansioso, evaluado en dos pruebas de ansiedad (OF y EPM). A su vez, se evidenció en este modelo animal de DM1, que los ratones presentaron diferencias a nivel molecular en ciertas regiones del cerebro que modulan la ansiedad, en comparación con ratones control, además de mostrar cambios en variables fisiológicas (glicemia y peso corporal). Se demostró que la cantidad relativa de CaMKIV y CREB, así como la relación pCREB/CREB vio afectada luego de tres meses desde la constatación de la hiperglicemia, sin haber recibido los animales, ningún tratamiento antidiabético.

Todos los animales inyectados con STZ mostraron niveles de glicemia mayores a 250 mg/dL (promedio en GD: $593,9 \pm 4,5$ mg/dL) al momento de la eutanasia, evidenciando el estrés metabólico crónico en el que se encontraron estos ratones. La hiperglicemia crónica concuerda con otros trabajos que reportaron altos niveles de glucosa en sangre luego de la administración de STZ en ratones (Nitta et al., 2002; Zhuravliova et al., 2009; Pamidi & Santheesha, 2012; Benech et al., 2014; Chen et al., 2014; Damián et al., 2014; Gupta et al., 2014; Wang et al., 2016). Por otro lado, en todos los animales hubo un aumento en el peso corporal a lo largo del tiempo. Sin embargo, en el GD este aumento se vio atenuado respecto al GC, encontrándose diferencias significativas entre grupos en los meses 3 y 3.5 luego de la inyección. Esa diferencia en el peso corporal entre ambos grupos coincide con otros trabajos publicados (Hilakivi-Clarke et al., 1990; Pamidi & Satheesha, 2012), y refuerza desde otro punto de vista fisiológico la condición de estrés crónico. Por lo tanto, los ratones inyectados con STZ mostraron claros síntomas de DM crónica.

La dosis de STZ utilizada se basó en reportes previos de estudios en ratones, donde utilizaban 150-200 mg/kg (Trost et al., 2002; Shiomi et al., 2003; Boudina & Abel, 2007; Sulaiman et al., 2010; Benech et al., 2014). La STZ no cruza la barrera hematoencefálica y tiene una tasa de excreción temprana (Schein, 1969; Karunanayake et al., 1974). Por lo tanto, es aceptado que la disfunción del SNC en los ratones inyectados con STZ es generada por el estado de hiperglicemia inducida y no por la STZ por sí misma (Miyata et al., 2007).

Perfil comportamental

Los ratones del GD mostraron un perfil comportamental de tipo ansioso en ambas pruebas (OF y EPM). Durante el OF, esto fue evidenciado en el GD por una menor frecuencia de

grooming y una tendencia a aumentar en la frecuencia y el tiempo de *freezing*, respecto al GC. El comportamiento de *freezing* es un indicador de miedo (Koolhaas et al., 1999). Este resultado es concordante con otros, donde se observó que modelos roedores de DM mostraban una mayor frecuencia de *freezing* durante la exposición a un estímulo estresante (Miyata et al., 2007; Caliskan et al., 2019). En contraparte, el *grooming* o acicalamiento constituye un comportamiento innato, que se manifiesta como un procedimiento autocalmante en roedores (Enginar et al., 2008). El comportamiento de *grooming* también ha sido asociado con un estado ansiolítico (Belviranli et al., 2012). La mayor actividad de *grooming* observada en el GC podría ser una forma en la que intentan evitar, resolver o adaptarse a la situación de ansiedad del OF (Damián et al., 2014), lo cual no ocurre en el GD.

Respecto al EPM, en este trabajo encontramos un aumento en los comportamientos de tipo ansioso en el GD, lo cual se evidenció por una disminución significativa en el tiempo y la frecuencia de entradas a los BA y una tendencia a pasar más tiempo en los BC. Además, el GD tuvo una mayor frecuencia de BA/BT y BA/BC. Estos resultados están en acuerdo con reportes previos en roedores (Ramanathan et al., 1998; Jung et al., 2010; Gupta et al., 2014; Rebai et al., 2017; Patel et al., 2018; Mbianchta et al., 2019; Tsafack et al., 2021).

Se ha reportado que la DM inducida con STZ se asocia a comportamientos de tipo ansioso y que la administración de insulina puede revertirlo (Miyata et al., 2007; Gupta et al., 2014), siendo un modelo efectivo para evaluar consecuencias neuroconductuales de la DM. De hecho, la administración de diferentes drogas psicotrópicas utilizadas para tratar individuos con síntomas de ansiedad, como diazepam o fluoxetina, provoca una atenuación de los patrones de comportamientos asociados a la ansiedad en ratones con DM inducida con STZ (Ramanathan et al., 1998; Yuan et al., 2019).

La distancia recorrida y velocidad en el OF, así como el número total de entradas a ambos brazos (frecuencia en BT, BA+BC) en el EPM no se vio afectada, lo que permite sugerir que aparentemente los ratones del GD no manifiestan un déficit en la función motora evaluada en estas condiciones. En base a lo mencionado anteriormente, como resultado de ambas pruebas (OF y EPM), concluimos que los animales utilizados en este estudio con tres meses de hiperglicemia crónica y sin tratamiento antidiabético, exhibieron un perfil comportamental de tipo ansioso.

Inmunodetección de proteínas

En lo que respecta a los cambios en la inmunodetección de las proteínas en las diferentes regiones analizadas del cerebro, este es el primer trabajo que muestra que la cantidad relativa de CaMKIV se ve afectada en el hipocampo de un modelo animal de DM. El manejo de las emociones, el aprendizaje y la memoria son algunas de las funciones asociadas al hipocampo (Alvarez et al., 2009). Estos procesos en los que está involucrada la plasticidad sináptica del hipocampo, pueden alterarse tanto en humanos como en modelos animales de DM (Biessels et al., 1996; Chabot, et al., 1997). El hipocampo es una de las regiones del cerebro más sensible a la DM (Shin et al., 2019). Se ha reportado que ratones diabéticos inducidos con STZ muestran alteraciones estructurales y funcionales en el hipocampo, como ser disminución tanto de la plasticidad sináptica como de la neurogénesis adulta en modelos animales de DM, astrogliosis hipocampal, atrofia dendrítica de las neuronas piramidales CA1 y CA3, y disminución en el número de neuronas hiliares en el giro dentado (Kamal et al., 2000; Saravia et al., 2004; Beauquis et al., 2006; Stranahan et al., 2008; Reagan, 2012), así como daño neural y disminución en la supervivencia celular (Alvarez-Nölting et al., 2012). Estos cambios sugieren neurodegeneración en el hipocampo en los ratones inyectados con STZ (Beauquis et al., 2006; Reagan, 2012). También se ha reportado alteración de la potenciación a largo plazo (LTP) en el giro dentado de ratas con DM inducida por STZ, (Biessels et al., 1996; Stranahan et al., 2008). En contraposición, la administración crónica de fluoxetina previene la reducción de la proliferación celular causada por la DM inducida por STZ (Beauquis et al., 2006). A su vez, se ha reportado que el uso de fluoxetina en roedores no diabéticos aumenta la neurogénesis hipocampal (Huang & Herbert, 2006; Wang et al., 2008), así como la cantidad o el nivel de fosforilación de CaMKIV en algunas regiones del SNC, como el hipocampo y la corteza prefrontal (Tiraboschi et al., 2004b; Kong et al. 2009; Tardito et al. 2009; Song 2013). En esta tesis hemos encontrado una disminución significativa en la abundancia relativa de CaMKIV hipocampal en el GD respecto al GC. Sin embargo, no se detectaron cambios en esta proteína en las otras regiones analizadas. Esta es la primera vez que se evalúa CaMKIV en el cerebro de un modelo animal de DM, y en relación a cambios comportamentales de tipo ansioso. Por lo tanto, la disminución en la inmunodetección de CaMKIV detectada a nivel del hipocampo podría evidenciar una disfunción hipocampal y contribuir al perfil compartamental del tipo ansioso que se observa en el GD.

El análisis de CaMKIV en el hipocampo, fue realizado por Western blot en homogenados de esta región del cerebro. Sin embargo, este tipo de estudio, no proporciona información sobre posibles cambios en la localización espacial de dicha proteína. Para obtener esta información, en el presente trabajo también se realizó un análisis de CaMKIV a nivel del hipocampo

utilizando Microscopía Láser Confocal. Reportes previos donde analizan CaMKIV por inmunohistoquímica/inmunofluorescencia en animales sanos, detectaron su localización principalmente en el stratum pyramidale y la capa de células granulares (Arrázola et al., 2009; Moriguchi et al., 2014). En este trabajo de tesis, se detectó señal de CaMKIV en el giro dentado, CA1, CA2 y CA3 en todos los animales, observándose una distribución más similar a la reportada por Tang et al. (2021), en el cual no utilizan animales adultos, sino crías de ratas de 21 días de edad. En el GC, la señal de fluorescencia se mostró más restringida al borde interno (superficie basal) de la hoja inferior de la capa de células granulares en el giro dentado y en la fisura hipocampal. En el GD, la señal de fluorescencia se mostró más uniforme, sin resaltar una señal tan clara y lineal y de manera marcada como el GC y en ninguna región en particular. Debido al bajo número de animales utilizado en este experimento, no se logró obtener resultados cuantitativos que permitieran realizar análisis estadísticos. Sin embargo, los resultados preliminares obtenidos, sugieren cambios en la distribución espacial de CaMKIV en el hipocampo de los ratones a los 3 meses de la constatación de la hiperglicemia. No hemos encontrado trabajos donde analicen la distribución de esta quinasa en modelos de DM. Por lo tanto, es posible que la DM no solo afecte la expresión de CaMKIV en el hipocampo, sino también su distribución, lo cual también podría estar vinculado al fenotipo comportamental en estas condiciones.

En relación a CaMKII, no detectamos cambios en la cantidad relativa de esta quinasa (en ninguna de las isoformas α o β) en las regiones analizadas, en las cuales se detectó señal mediante Western blot. Esto concuerda con aquellos reportados por Di Luca et al. (1999) y Gardoni et al. (2002), donde no detectaron cambios a nivel del hipocampo y corteza entre animales control y modelo de DM1. Sin embargo, en estos trabajos, la actividad de CaMKII- α (no evaluaron la isoforma β) se vio disminuida en ratas con 4 meses de DM inducida con STZ. Esto fue evidenciado realizando un ensayo in vitro, donde agregaron de manera exógena *syntide-2* (un polipéptido sintético sustrato de CaMKII) a extractos de densidades post-sinápticas (ricas en CaMKII) de hipocampo y corteza, en condiciones de presencia de Ca^{2+}/CaM , detectando un menor porcentaje de fosforilación de este sustrato en los extractos provenientes de ratones diabéticos, lo cual refleja el cambio en la actividad de CaMKII (Di Luca et al., 1999; Gardoni et al., 2002). Además, Gardoni et al. (2002) también detectaron una disminución en los niveles de autofosforilación en Thr-286 de CaMKII. A su vez, Liao et al. (2013) reportaron una disminución de pCaMKII tanto α como β , y un aumento de CaMKII total en el hipocampo de ratas con un mes de DM1 inducida con STZ. En nuestro trabajo no evaluamos los niveles de pCaMKII, por lo que no pudimos determinar el porcentaje de la enzima que se encuentra activa en las regiones analizadas. Además, no se encontraron

trabajos en los que se haya analizado CaMKII en regiones como corteza prefrontal, amígdala o hipotálamo de modelos animales de DM.

Respecto al factor transcripcional CREB, hemos encontrado un aumento de esta proteína en la amígdala y el hipotálamo. Este estudio es el primero en evaluar CREB en dichas regiones de un modelo animal de DM. Los estímulos psicológicos inducen la activación de un gran número de áreas del SNC, incluyendo a la amígdala y la corteza prefrontal (Nadal & Armario, 2010), regiones involucradas más directamente en la emoción y la cognición, y que están conectadas con el hipocampo (Duman & Monteggia, 2006). La información sensorial luego de ser procesada, converge al hipotálamo, el cual está involucrado en la respuesta fisiológica del estrés (Kent et al., 2002). Se ha visto que la amígdala, contrario a la corteza prefrontal y el hipocampo, es hipertrófica e hiperactiva en el desorden de depresión mayor, lo cual se correlaciona con la intensidad del afecto negativo (Abercrombie et al., 1998), pudiendo estar relacionado con la sobreactivación de circuitos que controlan el miedo, la ansiedad y la emoción. Esto podría estar relacionado con el aumento de CREB en la amígdala evidenciado en este trabajo. El aumento total de CREB es uno de varios mecanismos bajo los que se regula la función de esta proteína (Duman et al., 1997), que parecería estar alterada en el GD respecto al GC.

La mayoría de las vías de señalización que activan CREB llevan a la fosforilación del residuo de serina 133 (Ser133), lo cual es requerido para la transcripción génica inducida por CREB. En este trabajo detectamos que la relación pCREB/CREB se vio significativamente disminuida en el hipotálamo, lo cual refleja una regulación a la baja en la actividad de CREB. Es importante notar que además de CaMKIV y CaMKII, la activación de CREB puede ser inducida por múltiples quinasas, como se mencionó anteriormente. Por otro lado, se ha detectado por estudios in vitro que CaMKIV mediaría la fosforilación transitoria de CREB, mientras MAPK está involucrada en la fosforilación prolongada de CREB (Dolmetsch et al., 2001; Wu et al., 2001). Sin embargo, estudios in vivo han demostrado que CaMKIV modula tanto la activación basal de CREB como la transitoria (Ho et al., 2000; Ribar et al., 2000). De todos modos, CaMKIV debe ser fosforilada por CaMKK para la importación al núcleo y fosforilación de CREB (Chow et al., 2005). En este trabajo esto no fue evaluado, por lo que no determinamos el porcentaje de activación de CaMKIV en cada región del cerebro para ambos grupos. De la misma manera, tampoco hemos analizado si hay una alteración en los niveles de fosforilación de CaMKII, que también pudieran contribuir a cambios en la actividad de CREB.

La mayoría de los reportes donde analizan este factor de transcripción en modelos animales de DM, muestran una menor cantidad relativa de CREB en hipocampo, así como de su estado fosforilado (pCREB) en modelos animales de DM1 (Zhuravliova et al., 2009; Ma et al., 2011; Tang et al., 2018; Zborowski et al., 2019; Nadimi et al., 2019; Ripoli et al., 2020; Thapak et al., 2020) y DM2 (Wu et al., 2020; Liu et al., 2020; Li et al., 2020; He et al., 2020). Sin embargo, hay algunas inconsistencias: no detectándose cambios (Datusalia & Sharma, 2014), o encontrándose un aumento en CREB (Feng et al., 2020), pCREB (Ma et al., 2015) y pCREB/CREB (Miao et al., 2015; Feng et al., 2020) en ratas modelo de DM2. Respecto a la corteza prefrontal, Datusalia & Sharma (2014) y Ke et al. (2020) detectaron una disminución en pCREB/CREB en ratas Sprague-Dawley, mientras que He et al. (2020) encontraron pCREB/CREB inalterado en ratones C57BL/6J, ambos modelos de DM2. En este trabajo no detectamos cambios significativos en la cantidad relativa de CREB o pCREB/CREB en dicha región del cerebro de los ratones pertenecientes al GD, en relación a lo detectado en el GC.

La actividad y especificidad de CREB también puede ser modulada tanto por fosforilación de sitios adicionales como Ser142 y Ser143, o de proteínas asociadas a CREB, resultando en un programa de expresión génica diferente (Sun et al., 1994; Shaywitz & Greenberg, 1999; Kornhauser et al., 2002). Curiosamente, un mecanismo adicional de regulación de CREB diferente a la fosforilación es aquel dirigido por una familia de proteínas llamado transductores de la actividad regulada de CREB (TORCs por sus siglas en inglés) (Conkright et al., 2003; lourenko et al., 2003). Sin embargo, de acuerdo a nuestro conocimiento, no hay reportes relacionados a alteraciones de TORCs causadas por la DM. Por todo lo mencionado anteriormente, podría ser posible que nuestros resultados reflejen los efectos de múltiples vías de señalización actuando sobre la expresión o potencial actividad de CREB. Por lo tanto, se requiere continuar la investigación para dilucidar qué vías de señalización convergen en CREB, y en qué sentido (estimulación o inhibición de las vías) se producirían alteraciones que generan en última instancia los efectos sobre los niveles de fosforilación de CREB evidenciados en el GD.

Un gen blanco de CREB es BDNF (Shaywitz & Greenberg, 1999; Mantamadiotis et al., 2002; Lonze & Ginty, 2002). Se ha reportado que la proteína BDNF disminuye en el hipocampo y la corteza prefrontal en diferentes modelos roedores de DM1 (Nitta et al., 2002; Lenart et al., 2016; Redivo et al., 2016; Tang et al., 2018; Yang et al., 2018; Gürbüz et al., 2019; Ripoli et al., 2020) y DM2 (Sona et al., 2018; Zborowski et al., 2019; Ke et al., 2020; Liu et al., 2020; Wu et al., 2020). Sin embargo, algunos reportes no detectaron cambios de BDNF entre el modelo animal de DM1 y controles en estas regiones (Ho et al., 2012; Nadimi et al., 2019; Yang et al., 2019). Los resultados obtenidos en nuestro trabajo no mostraron diferencias

significativas entre el GD y el GC en los niveles de BDNF en ninguna de las regiones analizadas en el cerebro, más allá de mostrar una tendencia a aumentar en el hipotálamo del GD. Es importante marcar que los niveles de BDNF pueden ser regulados también por mecanismos independientes de CREB (Hong et al., 2008; Lang et al., 2020). Además, la contribución de la transcripción de BDNF dependiente de CREB a la expresión total de esta neurotrofina no se conoce (Kokubo et al., 2009).

La diferencia entre nuestros resultados y reportes previos podría deberse a diferentes períodos de tiempo a los cuales se mantiene a los animales con hiperglicemia, a la edad en la cual se inyecta la STZ o a las distintas cepas animales utilizadas. Por ejemplo, en algunos trabajos se utilizaron ratones C57BL, a los cuales se les inyectó STZ a las 8-10 (Ho et al., 2012; Zborowski et al., 2019), o 16 semanas de edad (Yang et al., 2018). Otro trabajo utilizó ratones ICR de 8-10 semanas de edad (Tang et al., 2018). El período de tiempo luego de la inducción de hiperglicemia varió desde 2-3 semanas (Ho et al., 2012; Zborowski et al., 2019), 4 semanas (Tang et al., 2018), a 5-6 semanas (Yang et al., 2018). Otros utilizaron una dieta rica en grasas, un modelo de DM2 (Sona et al., 2018; He et al., 2020; Lang et al., 2020; Liu et al., 2020). Nuestro análisis se llevó a cabo luego de 3 meses desde la constatación de hiperglicemia en ratones machos CD1 de 45 días de edad, a los cuales no se les administró ningún tratamiento antidiabético. Se presume que la expresión de BDNF depende del tiempo transcurrido desde la última inducción de estrés (Morshedi et al., 2018), y podemos considerar a la hiperglicemia como un factor de estrés metabólico crónico para el animal (Revsin et al., 2008; Reagan, 2012). Por lo tanto, hubiera sido interesante evaluar también las diferentes proteínas en etapas tempranas de la enfermedad, como por ejemplo 15 días o un mes luego de la confirmación de la hiperglicemia, ya que podrían estar actuando mecanismos homeostáticos compensatorios, generando adaptación y recuperación de la expresión de BDNF, y llevando a que no se encuentren diferencias entre ratones diabéticos y controles en esta proteína, al haberse establecido la hiperglicemia crónica.

A modo general, los cambios detectados en estas proteínas de señalización celular (principalmente CaMKIV y CREB) en las diferentes regiones del cerebro que fueron evaluadas, y que están vinculadas a la modulación de la ansiedad, podrían estar evidenciando algún tipo de implicancia en el perfil comportamental de tipo ansioso que presentan los animales diabéticos. Sin embargo, sería prematuro especular en base a estos resultados, sobre el papel patológico de la alteración de estas proteínas de señalización en el cerebro de los ratones diabéticos. De todos modos, la determinación de una relación entre las alteraciones a nivel molecular encontradas en este trabajo de tesis y el perfil comportamental de modelos animales de DM abren nuevas puertas para futuros trabajos. El

tratar de reducir los efectos negativos que tiene la DM, con la intención de mejorar la calidad de vida y bienestar de quienes padecen dicha enfermedad es una de las prioridades en lo que respecta a la salud humana. Por lo tanto, continuar con este tipo de investigación aportaría en la búsqueda de posibles blancos terapéuticos para trastornos afectivos/emocionales, que a su vez están asociados con la DM.

Conclusiones

En el modelo de DM1 utilizado mediante inducción de STZ, los ratones presentaron un perfil comportamental de tipo ansioso evaluado en dos pruebas de ansiedad (OF y EPM), y cambios en la cantidad relativa detectada de las proteínas de señalización celular en las diferentes regiones del cerebro vinculadas a la ansiedad: una disminución de CaMKIV en el hipocampo, un aumento de CREB en la amígdala e hipotálamo, así como una disminución en hipotálamo de pCREB/CREB. Los resultados preliminares de inmunofluorescencia sugieren cambios en la localización de CaMKIV en el hipocampo de los ratones diabéticos. Es necesario profundizar en la investigación para determinar la posible relación entre los cambios en CaMKIV y CREB, con este perfil comportamental en estos animales y se requiere más evidencia para dilucidar los posibles mecanismos que subyacen estas alteraciones. Este es el primer trabajo donde se evidencian cambios significativos en la abundancia relativa de CaMKIV en el hipocampo y de CREB en la amígdala e hipotálamo de un modelo animal de DM1.

Perspectivas

- Analizar el nivel de fosforilación de las quinasas CaMKIV y CaMKII en las diferentes regiones del cerebro con el fin de determinar la potencial contribución a la fosforilación de CREB. A su vez, con el fin de obtener evidencias más directas del efecto de estas quinasas sobre CREB, mediante la administración de inhibidores de CaMKII (AIP, *autocamtide-2-related inhibitory peptide*) y de CaMKIV (KN93) en regiones específicas del cerebro, se puede evaluar si la relación pCREB/CREB se modifica en los ratones inyectados con STZ, comparado con inyectados, pero sin la administración de los inhibidores de las quinasas.
- Evaluar la cantidad de las diferentes proteínas dentro de un período menor de tiempo desde la inducción y confirmación de la condición diabética (por ejemplo, un mes después) para determinar si se encuentran diferencias significativas entre el GC y el GD.
- Realizar todos los procedimientos descritos en esta tesis en ratones controles e inyectados con STZ a los cuales se les haya administrado un tratamiento con insulina, y en paralelo un tratamiento con fluoxetina, durante el período de estudio. La creación de estos grupos animales tendría como finalidad determinar si se revierten los cambios observados desde el punto de vista comportamental, así como en la abundancia de las proteínas analizadas en las cuales se detectaron cambios significativos.
- Profundizar en el análisis de imágenes de Microscopía Láser Confocal:
 - Obtener imágenes a mayor aumento para cuantificar el porcentaje de CamKIV que se localiza fuera y dentro del núcleo.
 - Realizar inmunofluorescencia de CaMKIV en amígdala, corteza prefrontal e hipotálamo y obtener imágenes con el fin de comparar si ocurren cambios en la localización entre el GC y el GD.
 - Extender el análisis a las otras proteínas en estudio (CaMKII, CREB y BDNF).

Agradecimientos

Quiero agradecer a mi tutor, Dr. Juan Pablo Damián, por su gran compromiso, por su ayuda durante el periodo experimental y de análisis de datos, por su dedicación y aportes brindados a lo largo de la realización de esta tesis. A mi Co-tutor, Dr. Juan Claudio Benech por el espacio brindado en su laboratorio, por su disposición, aportes, y tiempo dedicado. A quienes, de distintas maneras, también colaboraron durante la realización de este trabajo de tesis en el Laboratorio de Señalización Celular y Nanobiología del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE), Sofía Rivero, Laura Bengoa, Gerardo Romanelli y Rocío Varela.

También agradecer a José Pedro Prieto por su ayuda y el acceso al software Ethovision XT 7.0 para realizar los análisis de las pruebas de comportamiento (Campo abierto y Laberinto Elevado en Cruz), y a Cecilia Scorza (IIBCE) por permitirnos utilizar las facilidades de su laboratorio. Agradecer a Carlos Escande (Institut Pasteur de Montevideo) por abrir las puertas de su laboratorio y especialmente a Karina Cal por su ayuda y buena disposición. Al personal del Bioterio del IIBCE por su ayuda con el manejo y el cuidado de los animales.

A las instituciones financiadoras, la Comisión Académica de Posgrado, a la Agencia Nacional de Investigación e Innovación y a PEDECIBA, por el apoyo en hacer posible este trabajo de tesis.

Por último, quiero agradecer especialmente a mi familia y amigos, por el apoyo constante, y a todas las personas que, de una u otra manera, han formado parte.

¡Muchas gracias!

Referencias

- Abercrombie, H.C., Schaefer, S.M., Larson, C.L., Oakes, T.R., Lindgren, K.A., Holden, J.E., Perlman, S.B., Turski, P.A., Krahn, D.D., Benca, R.M., Davidson, R.J. Metabolic rate in the right amygdala predicts negative affect in depressed patients. *Neuroreport*. 1998, 9(14): 3301-3307.
- Akbarzadeh, A., Norouzi, D., Mehrabi, M. R., Jamshidi, S., Farhangi, A., Allah Verdi, A., Mofidian, S.M.A., Lame Rad, B. Induction of diabetes by Streptozotocin in rats. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*. 2007, 22(2): 60–64.
- Alberti, K.G.M.M., Zimmet, P.Z. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus. Provisional Report of a WHO Consultation. *Diabet Med*. 1998, 15: 539–553. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9136\(199807\)15:7<539::AID-DIA668>3.0.CO;2-S](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9136(199807)15:7<539::AID-DIA668>3.0.CO;2-S)
- Altman, J. Autoradiographic and Histological Studies of Postnatal Neurogenesis IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *J. Comp. Neur.* 1969, 137: 433-458.
- Altman, J., Das, G.D. Autoradiographic and Histological Evidence of Postnatal Hippocampal Neurogenesis in Rats. *The Journal of Comparative Neurology*. 1965, 124(3): 319-336.
- Alvarez, E.O., Beauquis, J., Revsin, Y., Banzan, A.M., Roig, P., De Nicola, A.F., Saravia, F. Cognitive dysfunction and hippocampal changes in experimental type 1 diabetes. *Behavioural Brain Research*. 2009, 198(1): 224–230.
- Alvarez-Nölting, R., Arnal, E., Barcia, J.M., Miranda, M., Romero, F.J. Protection by DHA of early hippocampal changes in diabetes: possible role of CREB and NF-κB. *Neurochemical research*. 2012, 37(1): 105-115. <https://doi.org/10.1007/s11064-011-0588-x>
- American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2014, 37(1): 81-90. doi:10.2337/dc14-S081
- American Diabetes Association. Classification and diagnosis of diabetes. *Diabetes Care*. 2015; 38(1): 8-16. doi:10.2337/dc15-S005
- American Psychiatric Association. *The Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, fourth ed. 1994.
- Andero, R., Choi, D.C., Ressler, K.J. BDNF–TrkB receptor regulation of distributed adult neural plasticity, memory formation, and psychiatric disorders. *Progress in molecular biology*

and translational science. 2014, 122: 169-192. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420170-5.00006-4>

Anderson, K.A., Kane, C.D. Ca^{2+} /Calmodulin-dependent protein kinase IV and calcium signaling. *BioMetals*. 1998, 11: 331–343.

Anderson, R.J., Freedland, K.E., Clouse, R.E., Lustman, P.J. The prevalence of comorbid depression in adults with diabetes: a meta-analysis. *Diabetes care*. 2001, 24(6): 1069-1078. <https://doi.org/10.2337/diacare.24.6.1069>

Arrázola, M., Varela-Nallar, L., Colombres, M., Toledo, E.M., Cruzat, F., Pavez, L., Assar, R., Aravena, A., González, M., Montecino, M., Maass, A., Martínez, S., Inestrosa, N.C. Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase Type IV Is a Target Gene of the Wnt/b-Catenin Signaling Pathway. *Journal Of Cellular Physiology*. 2009, 221: 658-667. DOI: 10.1002/jcp.21902

Aswar, U. Chepurwar, S., Shintre, S., Aswar, M. Telmisartan attenuates diabetes induced depression in rats. *Pharmacological reports*. 2017, 69(2): 358-364. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2016.12.004>

Atkinson, M.A., Eisenbarth, G.S., Michel, A.W. Type 1 diabetes. *Lancet*. 2014, 383(9911): 69–82. doi:10.1016/S0140-6736(13)60591-7

Barlow, D.H. *Anxiety and its disorders: The nature and treatment of anxiety and panic*. New York: Guilford Press. 2002.

Beauquis, J., Roig, P., Homo-Delarche, F., De Nicola, A., Saravia, F. Reduced hippocampal neurogenesis and number of hilar neurones in streptozotocin-induced diabetic mice: reversion by antidepressant treatment. *European Journal of Neuroscience*. 2006, 23(6): 1539–1546.

Belviranlı, M., Atalik, K.E.N., Okudan, N., Gökbel, H. Age and sex affect spatial and emotional behaviors in rats: The role of repeated elevated plus maze test. *Neuroscience*. 2012, 227: 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.09.036>

Benech, J.C., Benech, N., Zambrana, A.I., Rauschert, I., Bervejillo, V., Oddone, N., Damián, J.P. Diabetes increases stiffness of live cardiomyocytes measured by atomic force microscopy nanoindentation. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*. 2014, 307: C910–C919. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00192.2013>

Bequer, L., Gómez, T., Molina, J. L., Artiles, D., Bermúdez, R., Clapés, S. Acción de la estreptozotocina en un modelo experimental de inducción neonatal de la diabetes. *Biomedica*. 2016, 36(2): 230–238.

Biessels, G.J., Kappelle, A C., Bravenboer, B., Erkelens, D.W., Gispen, W.H. Cerebral function in diabetes mellitus. *Diabetologia*. 1994, 37 (7): 643-650. <https://doi.org/10.1007/BF00417687>

Biessels, G.J., Kamal, A., Ramakers, G.M., Urban, I.J., Spruijt, B.M., Erkelens, W.D., Gispen, W.H. Place learning and hippocampal synaptic plasticity in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes*. 1996, 45(9): 1259–1266.

Biessels, G.J., Deary, I.J., Ryan, C.M. Cognition and diabetes: a lifespan perspective. *Lancet Neurology*. 2008, 7(2): 184–190.

Bito, H., Deisseroth, K., Tsien, R.W. CREB phosphorylation and dephosphorylation: a Ca²⁺- and stimulus duration-dependent switch for hippocampal gene expression. *Cell*. 1996, 87(7): 1203-1214. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81816-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81816-4)

Blendy, J.A. The Role of CREB in Depression and Antidepressant Treatment. *Biol Psychiatry*. 2006, 59: 1144 –1150. doi:10.1016/j.biopsych.2005.11.003

Boudina, S., Abel, E.D. Diabetic cardiomyopathy revisited. *Circulation*. 2007; 115: 3213-3223. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.679597

Bradford, M.M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*. 1976, 72(1–2): 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

Braun, A.P., Schulman, H. The multifunctional calcium/calmodulin-dependent protein kinase: From Form to Function. *Annu. Rev. Physiol*. 1995, 57:417-45. DOI: 10.1146/annurev.ph.57.030195.002221

Caliskan, H., Akat, F., Tatar, Y., Zaloglu, N., Dursun, A.D., Bastug, M., Ficilar, H. H. Effects of exercise training on anxiety in diabetic rats. *Behavioural brain research*. 2019, 376: 112084. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.112084>

Carlezon Jr., W.A., Duman, R.S., Nestler, E.J. The many faces of CREB. *Trends in Neurosciences*. 2005, 28(8): 436-445. doi:10.1016/j.tins.2005.06.005

Celano E., Tiraboschi, E., Consogno, E., D'Urso, G., Mbakop, M.P., Gennarelli, M., de Bartolomeis A., Racagni G., Popoli, M. Selective Regulation of Presynaptic Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II by Psychotropic Drugs. *Society of Biological Psychiatry*. 2003, 53: 442–449. doi:10.1016/S0006-3223(03)01491-9

- Chabot, C., Massicotte, G., Milot, M., Trudeau, F., Gagné, J. Impaired modulation of AMPA receptors by calcium-dependent processes in streptozotocin-induced diabetic rats. *Brain Research*. 1997, 768(1–2), 249–256.
- Chatila, T., Anderson, K.A., Ho, N., Means, A. R. A Unique Phosphorylation-dependent Mechanism for the Activation of Ca²⁺/Calmodulin-dependent Protein Kinase Type IV/GR. *Journal of Biological Chemistry*. 1996, 271(35): 21542–21548. doi:10.1074/jbc.271.35.21542
- Chen, B., Dowlathshahi, D., MacQueen, G.M., Wang, J.F., Young, L.T. Increased hippocampal BDNF immunoreactivity in subjects treated with antidepressant medication. *Biological psychiatry*. 2001, 50(4): 260-265. [https://doi.org/10.1016/S0006-3223\(01\)01083-6](https://doi.org/10.1016/S0006-3223(01)01083-6)
- Chen, C., Wang, Y., Zhang, J., Ma, L., Gu, J., Ho, G. Contribution of neural cell death to depressive phenotypes of streptozotocin-induced diabetic mice. *Disease models & mechanisms*. 2014, 7(6): 723-730. <https://doi.org/10.1242/dmm.016162>
- Chow, F.A., Anderson, K.A., Noeldner, P.K., Means, A.R. The autonomous activity of calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV is required for its role in transcription. *Journal of Biological Chemistry*. 2005, 280(21): 20530–20538.
- Chrivia, J.C., Kwok, R.P.S., Lamb, N., Haglwara, M., Montminy, M.R., Goodman, R.H. Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP. *Nature*. 1993, 365: 855-859.
- Colbran, R.J. Inactivation of Ca²⁺/Calmodulin-dependent Protein Kinase II by Basal Autophosphorylation. *The journal of biological chemistry*. 1993, 268(10): 7163-7170.
- Colomer, J., Means, A.R. Physiological roles of the ca²⁺/cam-dependent protein kinase cascade in health and disease. E. Carafoli and M. Brini (eds.), *Calcium Signalling and Disease*. 2007, 169–214. Springer.
- Conkright, M.D., Canettieri, G., Sreaton, R., Guzman, E., Miraglia, L., Hogenesch, J.B., Montminy, M. TORCs: transducers of regulated CREB activity. *Molecular cell*. 2003, 12(2): 413-423. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2003.08.013>
- Couchonnal, L.F., Anderson, M.E. The role of calmodulin kinase II in myocardial physiology and disease. *Physiology*. 2008, 23(3): 151–159.
- Couper, J.J., Donaghue, K.C. Phases of diabetes in children and adolescents. *Pediatric Diabetes*. 2009, 10(12): 13–16. doi:0.1111/j.1399-5448.2009.00574.x
- Cunha, C., Brambilla, R., Thomas, K.L. A simple role for BDNF in learning and memory? *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 2010, 3: 1-14 doi: 10.3389/neuro.02.001.2010

Damián, J.P., Acosta, V., Da Cuña, M., Ramírez, I., Oddone, N., Zambrana, A., Bervejillo, V., Benech, J.C. Effect of resveratrol on behavioral Performance of Streptozotocin-induced diabetic mice in Anxiety tests. *Experimental animals*. 2014, 63(3): 277-287. <https://doi.org/10.1538/expanim.63.277>

Damián, J.P., Bausero, M., Bielli, A. Acute stress, hypothalamic-hypophyseal-gonadal axis and testicular function – A Review. *Annals of Animal Science*. 2015, 15(1): 31-50.

Damián, J.P., Vázquez Alberdi, L., Canclini, L., Rosso, G., Bravo, S.O., Martínez, M., Uriarte, N., Ruiz, P., Calero, M., Di Tomaso, M.V., Kun, A. Central Alteration in Peripheral Neuropathy of Trembler-J Mice: Hippocampal pmp22 Expression and Behavioral Profile in Anxiety Tests. *Biomolecules* 2021, 11, 601. <https://doi.org/10.3390/biom11040601>

Daneman D. Type 1 diabetes. *Lancet*. 2006; 367: 847–58. doi:10.1016/S0140-6736(06)68341-4

Datusalia, A.K., Sharma, S.S. Amelioration of diabetes-induced cognitive deficits by GSK-3 β inhibition is attributed to modulation of neurotransmitters and neuroinflammation. *Molecular neurobiology*. 2014, 50(2): 390-405. <https://doi.org/10.1007/s12035-014-8632-x>

Davis, M. The role of the amygdala in fear and anxiety. *Annu. Rev. Neurosci*. 1992, 15: 353-75.

Devendra, D., Liu, E., Eisenbarth, G.S. Type 1 diabetes: recent developments. *BMJ*. 2004, 328: 750-754. doi:10.1136/bmj.328.7442.750

Di Luca, M., Ruts, L., Gardoni, F., Cattabeni, F., Biessels, G. J., Gispen, W.H. NMDA receptor subunits are modified transcriptionally and post-translationally in the brain of streptozotocin-diabetic rats. *Diabetologia*. 1999, 42: 693-701.

Dias, B.G., Banerjee, S.B., Goodman, J.V., Ressler, K.J. Towards new approaches to disorders of fear and anxiety. *Current Opinion in Neurobiology*. 2013, 23:346–352.

Dodd, A.N., Kudla, J., Sanders, D. The language of calcium signaling. *Annual Review of Plant Biology*. 2010, 61: 593–620.

Dolmetsch, R.E., Pajvani, U., Fife, K., Spotts, J.M., Greenberg, M.E. Signaling to the nucleus by an L-type calcium channel-calmodulin complex through the MAP kinase pathway. *Science*. 2001, 294(5541): 333-339. doi: 10.1126/science.1063395

Du, J., Szabo, S.T., Gray, N.A., Manji, H.K. Focus on CaMKII: a molecular switch in the pathophysiology and treatment of mood and anxiety disorders. *International Journal of Neuropsychopharmacology*. 2004, 7: 243–248. DOI : 10.1017/S1461145704004432

Duman, R.S. Pathophysiology of depression: the concept of synaptic plasticity. *European psychiatry*. 2002, 17: 306-310. [https://doi.org/10.1016/S0924-9338\(02\)00654-5](https://doi.org/10.1016/S0924-9338(02)00654-5)

Duman, R.S., Heninger, G.R., Nestler, E.J. A molecular and cellular theory of depression. *Archives of general psychiatry*. 1997, 54(7): 597-606. doi:10.1001/archpsyc.1997.01830190015002

Duman, R.S., Malberg, J., Nakagawa, S., D'Sa, C. Neuronal plasticity and survival in mood disorders. *Biological psychiatry*. 2000, 48(8): 732-739. [https://doi.org/10.1016/S0006-3223\(00\)00935-5](https://doi.org/10.1016/S0006-3223(00)00935-5)

Duman, R.S., Monteggia, L.M. A neurotrophic model for stress-related mood disorders. *Biological psychiatry*. 2006, 59(12): 1116-1127. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2006.02.013>

Earley, B., Buckham-Sporer, K., Gupta, S., Pang, W., Ting, S. Biologic response of animals to husbandry stress with implications for biomedical models. *Open Access Animal Physiology*. 2010, 2: 25–42.

Eghbali, M., Curmi, J.P., Birnir, B., Gage, P.W. Hippocampal GABAA channel conductance increased by diazepam. *Nature*. 1997, 388: 71-75.

Enginar, N., Hatipoğlu, I., Firtina, M. Evaluation of the acute effects of amitriptyline and fluoxetine on anxiety using grooming analysis algorithm in rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 2008, 89(3): 450–455. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2008.02.001>

Erickson, J.R., Joiner, M.I.A., Guan, X., Kutschke, W., Yang, J., Oddis, C.V., Bartlett, R.K., Lowe, J.S., O'Donnell, S.E., Aykin-Burns, N., Zimmerman, M.C., Zimmerman, K., Ham, A.J.L., Weiss, R.M., Spitz, D.R., Shea, M.A., Colbran, R.J., Mohler, P.J., Anderson, M.E. A Dynamic Pathway for Calcium-Independent Activation of CaMKII by Methionine Oxidation. *Cell*. 2008, 133: 462–474. DOI 10.1016/j.cell.2008.02.048

Feng, W., Liu, Y., Ding, Y., Mao, G., Zhao, T., Chen, K., Qiu, X., Xu, T., Zhao, X.F., Wu, X., Yang, L. Typical neurobehavioral methods and transcriptome analysis reveal the neurotoxicity and mechanisms of di(2-ethylhexyl) phthalate on pubertal male ICR mice with type 2 diabetes mellitus. *Archives of Toxicology*. 2020. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02683-9>

Figurov, A., Pozzo-Miller, L.D., Olafsson, P., Wang, T., Lu, B. Regulation of synaptic responses to high-frequency stimulation and LTP by neurotrophins in the hippocampus. *Nature*. 1996, 381(6584): 706-709. <https://doi.org/10.1038/381706a0>

Fuchs, E., Flugge, G., Czeh, B. Remodeling of neuronal networks by stress. *Frontiers in Bioscience*. 2006, 11: 2746–2758.

Fukunaga, K., Moriguchi, S. Stimulation of the Sigma-1 Receptor and the Effects on Neurogenesis and Depressive Behaviors in Mice. *Sigma Receptors: Their Role in Disease and as Therapeutic Targets*. 2017, 201-211.

Gao, M., Ji, S., Li, J., Zhang, S. DL-3-n-butylphthalide (NBP) ameliorates cognitive deficits and CaMKII-mediated long-term potentiation impairment in the hippocampus of diabetic db/db mice. *Neurological Research*. 2019. DOI: 10.1080/01616412.2019.1672387

Gardoni, F., Kamal, A., Bellone, C., Biessels, G.J., Ramakers, G.M.J., Cattabeni, F., Gispen, W.H., Di Luca, M. Effects of streptozotocin-diabetes on the hippocampal NMDA receptor complex in rats. *Journal of Neurochemistry*. 2002, 80: 438-447.

Glovaci, D., Fan, W., Wong, N.D. Epidemiology of diabetes mellitus and cardiovascular disease. *Current Cardiology Reports*. 2019, 21: 21. <https://doi.org/10.1007/s11886-019-1107-y>

Gorman, J.M. Treatment of Generalized Anxiety Disorder. *J Clin Psychiatry*. 2002, 63(8): 17-23.

Govoni, S., Amadio, M., Battaini, F., Pascale, A. Senescence of the brain: focus on cognitive kinases. *Current Pharmaceutical Design*. 2010, 16: 660-671.

Griffith, L.C. Regulation of Calcium/Calmodulin-dependent protein kinase II activation by intramolecular and intermolecular interactions. *Journal of Neuroscience*. 2004, 24(39): 8394–8398.

Groenewegen, H.J., der Zee, E.V.V., te Kortschot, A., Witter, M. P. Organization of the projections from the subiculum to the ventral striatum in the rat. A study using anterograde transport of *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin. *Neuroscience*. 1987, 23(1): 103–120. doi:10.1016/0306-4522(87)90275-2

Gupta, D., Radhakrishnan, M., Kurhe, Y. Insulin reverses anxiety-like behavior evoked by streptozotocin-induced diabetes in mice. *Metabolic Brain Disease*. 2014, 29: 737–746. <https://doi.org/10.1007/s11011-014-9540-5>

Gürbüz, P., Düzova, H., Yildiz, A., Çakan, P., Kaya, G.B., Bağ, H.G.G., Taşlıdere, A.Ç. Effects of noopept on cognitive functions and pubertal process in rats with diabetes. *Life sciences*. 2019, 233: 116698. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.116698>

Hagiwara, M., Alberts, A., Brindle, P., Meinkoth, J., Feramisco, J., Beng, T., Karin, M., Shenolikar, S., Montminy, M. Transcriptional Attenuation Following CAMP Induction Requires PP-1 –Mediated Dephosphorylation of CREB. *Cell*. 1992, 70: 105-113.

Hall, C.S. Emotional behavior in the rat: I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. *Journal of Comparative Psychology*. 1934, 18: 385-403.

Hall, C. S. Emotional behavior in the rat. III. The relationship between emotionality and ambulatory activity. *Journal of Comparative Psychology*. 1936, 22(3): 345-352.

Hanson, P.I., Schulman, H. Neuronal Ca²⁺/Calmodulin-dependent protein kinases. *Annual Review of Biochemistry*. 1992, 61(1): 559–601.

Hasegawa, S., Furuichi, T., Yoshida, T., Endoh, K., Kato, K. Sado, M., Maeda, R., Kitamoto, A., Miyao, T., Suzuki, R., Homma, S., Masushige, S., Kajii, Y., Kida, S. Transgenic up-regulation of alpha-CaMKII in forebrain leads to increased anxiety-like behaviors and aggression. *Molecular Brain*. 2009, 2:6. doi:10.1186/1756-6606-2-6

He, Y.X., Shen, Q.Y., Tian, J.H., Wu, Q., Xue, Q., Zhang, G.P., Wei, W., Liu, Y.H. Zonisamide Ameliorates Cognitive Impairment by Inhibiting ER Stress in a Mouse Model of Type 2 Diabetes Mellitus. *Frontiers in Aging Neuroscience*. 2020, 12: 192. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2020.00192>

Herman, J.P., Figueiredo, H., Mueller, N.K., Ulrich-Lai, Y., Ostrander, M.M., Choi, D.C., Cullinan, W.E. Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo–pituitary–adrenocortical responsiveness. *Frontiers in Neuroendocrinology*. 2003, 24: 151–180. doi:10.1016/j.yfrne.2003.07.001

Hilakivi-Clarke, L.A., Wozniak, K.M., Durcan, M.J., Linnoila, M. Behavior of Streptozotocin-Diabetic Mice in Tests of Exploration, Locomotion, Anxiety, Depression and Aggression. *Physiology & Behavior*. 1990, 48: 429--433.

Ho, N., Liauw, J.A., Blaeser, F., Wei, F., Hanissian, S., Muglia, Wozniak, D.F., Nardi, A., Arvin, K.L., Holtzman, D.M., Linden, D.J., Zhuo, M., Muglia, L.J., Chatila, T.A. Impaired synaptic plasticity and cAMP response element-binding protein activation in Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase type IV/Gr-deficient mice. *Journal of Neuroscience*. 2000, 20(17): 6459–6472.

Ho, N., Balu, D.T., Hilario, M.R., Blendy, J.A., Lucki, I. Depressive phenotypes evoked by experimental diabetes are reversed by insulin. *Physiology & behavior*. 2012, 105(3): 702-708. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2011.09.003>

Hohoff, C. Anxiety in mice and men: A comparison. *Journal of Neural Transmission*. 2009, 116(6): 679–687.

Hong, E.J., McCord, A.E., Greenberg, M.E. A biological function for the neuronal activity-dependent component of Bdnf transcription in the development of cortical inhibition. *Neuron*. 2008, 60(4): 610–624. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.09.024>

Huang, G.J., Herbert, J. Stimulation of neurogenesis in the hippocampus of the adult rat by fluoxetine requires rhythmic change in corticosterone. *Biological psychiatry*. 2006, 59(7): 619–624. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2005.09.016>

Hudmon, A., Schulman, H. Neuronal Ca²⁺/Calmodulin-dependent protein kinase II: The role of structure and autoregulation in cellular function. *Annual Review of Biochemistry*. 2002, 71: 473–510.

International Diabetes Federation. *Diabetes Atlas 9th edition* (2019).

lourgenko, V., Zhang, W., Mickanin, C., Daly, I., Jiang, C., Hexham, J.M., Orth, A.P., Miraglia, L., Meltzer, J., Garza, D., Chirn, G.W., McWhinnie, E., Cohen, D., Skelton, J., Terry, R., Yu, Y, Bodian, D., Buxton, F.P., Zhu, J., Song, C., Labow, M.A. Identification of a family of cAMP response element-binding protein coactivators by genome-scale functional analysis in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003, 100(21): 12147–12152. <https://doi.org/10.1073/pnas.1932773100>

Jensen, K.F., Ohmstedet, C.A., Fishert, R.S., Sahyoun, N. Nuclear and axonal localization of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase type Gr in rat cerebellar cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 1991, 88: 2850–2853.

Jin, J., Maren, S. Prefrontal-hippocampal interactions in memory and emotion. *Front. Syst. Neurosci*. 2015, 9:170. doi: 10.3389/fnsys.2015.00170

Johannessen, M., Delghandi, M.P., Moens, U. What turns CREB on? *Cellular Signalling*. 2004, 16: 1211 – 1227. doi:10.1016/j.cellsig.2004.05.001

Johnson, E.O., Kamilaris, T.C., Chrousos, G.P., Gold, P.W. Mechanisms of stress: a dynamic overview of hormonal and behavioral homeostasis. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 1992, 16(2): 115–130.

Jung, S.W., Han, O.K., Kim, S.J. Increased expression of β amyloid precursor gene in the hippocampus of streptozotocin-induced diabetic mice with memory deficit and anxiety induction. *Journal of neural transmission*. 2010, 117(12): 1411–1418. <https://doi.org/10.1007/s00702-010-0516-2>

- Kamal, A., Biessels, G.J., Duis, S.E.J., Gispen, W.H. Learning and hippocampal synaptic plasticity in streptozotocin-diabetic rats: interaction of diabetes and ageing. *Diabetologia*. 2000, 43(4): 500–506. <https://doi.org/10.1007/s001250051335>
- Karunanayake, E.H., Hearse, D.J., Mellows, G. The synthesis of [¹⁴C] streptozotocin and its distribution and excretion in the rat. *Biochemical Journal*. 1974, 142(3): 673-683. <https://doi.org/10.1042/bj1420673>
- Kasahara, J., Fukunaga, K., Miyamoto, E. Activation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV in long term potentiation in the rat hippocampal CA1 region. *J Biol Chem*. 2001, 276: 24044–24050. <https://doi.org/10.1074/jbc.M100247200>
- Ke, Y., Bu, S., Ma, H., Gao, L., Cai, Y., Zhang, Y., Zhou, W. Preventive and therapeutic effects of astaxanthin on depressive-like behaviors in high-fat diet and streptozotocin-treated rats. *Frontiers in pharmacology*. 2020, 10: 1621. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01621>
- Kent, J.M., Mathew, S.J., Gorman, J.M. Molecular targets in the treatment of anxiety. *Biological psychiatry*. 2002, 52(10): 1008-1030. [https://doi.org/10.1016/S0006-3223\(02\)01672-4](https://doi.org/10.1016/S0006-3223(02)01672-4)
- Kharroubi, A.T., Darwish, H.M. Diabetes mellitus: the epidemic of the century. *World J. Diabetes*. 2015, 6(6): 850-867. doi:10.4239/wjd.v6.i6.850
- Khuwaja, A.K., Lalani, S., Dhanani, R., Azam, I.S., Rafique, G., White, F. Anxiety and depression among outpatients with type 2 diabetes: a multi-centre study of prevalence and associated factors. *Diabetology and Metabolic Syndrome*. 2010, 2(1), 1–7.
- Kokubo, M., Nishio, M., Ribar, T.J., Anderson, K.A., West, A.E., Means, A.R. BDNF mediated cerebellar granule cell development is impaired in mice null for CaMKK2 or CaMKIV. *Journal of Neuroscience*. 2009, 29(28): 8901–8913. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0040-09.2009>
- Kong, H., Sha L.L., Fan, Y., Xiao, M., Ding, J.H., Wu., J., Hu, G. Requirement of AQP4 for Antidepressive Efficiency of Fluoxetine: Implication in Adult Hippocampal Neurogenesis. *Neuropsychopharmacology*. 2009, 34: 1263–1276. doi:10.1038/npp.2008.185
- Koolhaas, J.M., Korte, S.M., De Boer, S.F., Van Der Vegt, B.J., Van Reenen, C.G., Hopster, H., De Jonga, I.C., Ruis, M.A.W., Blokhuis, H.J. Coping styles in animals: current status in behavior and stress-physiology. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 1999, 23(7): 925-935. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(99\)00026-3](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(99)00026-3)

Kornhauser, J.M., Cowan, C.W., Shaywitz, A.J., Dolmetsch, R.E., Griffith, E.C., Hu, L.S., Haddad, C., Xia, Z., Greenberg, M.E. CREB transcriptional activity in neurons is regulated by multiple, calcium-specific phosphorylation events. *Neuron*. 2002, 34(2): 221-233. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(02\)00655-4](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(02)00655-4)

Kovalevskaya, N.V., van de Waterbeemd, M., Bokhovchuk, F.M., Bate, N., Bindels, R.J.M., Hoenderop, J.G.J., Vuister, G.W. Structural analysis of calmodulin binding to ion channels demonstrates the role of its plasticity in regulation. *Pflugers Arch - Eur J Physiol*. 2013, 465(11): 1507-1519. DOI 10.1007/s00424-013-1278-0

Kumar, T.P., Antony, S., Gireesh, G., George, N., Paulose, C.S. Curcumin modulates dopaminergic receptor, CREB and phospholipase C gene expression in the cerebral cortex and cerebellum of streptozotocin induced diabetic rats. *Journal of biomedical science*. 2010, 17(1): 1-11. <https://doi.org/10.1186/1423-0127-17-43>

Kwok, R.P., Lundblad, J.R., Chrivia, J.C., Richards, J.P., Bachinger, H.P., Brennan, R.G., Roberts, S.G.E., Green, M.R., Goodman, R.H. Nuclear protein CBP is a coactivator for the transcription factor CREB. *Nature*. 1994, 370: 223-226.

Kyrou, I., Tsigos, C. Stress hormones: physiological stress and regulation of metabolism. *Current Opinion in Pharmacology*. 2009, 9(6): 787–793.

Lang, X., Zhao, N., He, Q., Li, X., Li, X., Sun, C., Zhang, X. Treadmill exercise mitigates neuroinflammation and increases BDNF via activation of SIRT1 signaling in a mouse model of T2DM. *Brain Research Bulletin*. 2020, 165: 30-39. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2020.09.015>

Le Merre, P., Ährlund-Richter, S., Carlén, M. The mouse prefrontal cortex: Unity in diversity. *Neuron*. 2021, 109(12), 1925–1944. doi:10.1016/j.neuron.2021.03.035

Lenart, L., Hodrea, J., Hosszu, A., Koszegi, S., Zelena, D., Balogh, D., Szkibinszkij, E., Veres-Szekely, A., Wagner, L., Vannay, A., Szabo, A.J., Fekete, A. The role of sigma-1 receptor and brain-derived neurotrophic factor in the development of diabetes and comorbid depression in streptozotocin-induced diabetic rats. *Psychopharmacology*. 2016, 233(7): 1269–1278. <https://doi.org/10.1007/s00213-016-4209-x>

Lessmann, V., Gottmann, K., Malcangio, M. Neurotrophin secretion: current facts and future prospects. *Progress in Neurobiology*. 2033, 69: 341–374. doi:10.1016/S0301-0082(03)00019-4

- Li, Y., Xiang, Q., Yao, Y.H., Li, J.J., Wang, Y., Li, X.H. Inactivated AMPK- α 2 promotes the progression of diabetic brain damage by Cdk5 phosphorylation at Thr485 site. *Biochimie*. 2020, 168: 277-284. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2019.11.010>
- Liao, M.H., Xiang, Y.C., Huang, J.Y., Tao, R.R., Tian, Y., Ye, W.F., Zhang, G.S., Lu, Y.M., Ahmed, M.M., Liu, Z.R., Fukunaga, K., Han, F. The Disturbance of Hippocampal CaMKII/PKA/PKC Phosphorylation in Early Experimental Diabetes Mellitus. *CNS Neuroscience & Therapeutics*. 2013, 19: 329–336. doi: 10.1111/cns.12084
- Liu, S., Zheng, M., Li, Y., He, L., Cheng, T. The protective effect of Geniposide on diabetic cognitive impairment through BTK/TLR4/NF- κ B pathway. *Psychopharmacology*. 2020, 237: 465–477. <https://doi.org/10.1007/s00213-019-05379-w>
- Lonze, B.E., Ginty, D.D. Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. *Neuron*. 2002, 35(4): 605-623. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(02\)00828-0](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(02)00828-0)
- Lou, L.L., Lloyd, S.J., Schulman, H. Activation of the multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase by autophosphorylation: ATP modulates production of an autonomous enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1986, 83: 9497-9501.
- Löw, K., Crestani, F., Keist, R., Benke, D., Brünig I., Benson, J.A., Fritschy, J.M., Rüllicke, T., Bluethmann, H., Möhler, H., Rudolph, U. Molecular and neuronal substrate for the selective attenuation of anxiety. *Science*. 2000, 290(5489): 131-134.
- Lyons, M.R., West, A.E. Mechanisms of specificity in neuronal activity-regulated gene transcription. *Progress in Neurobiology*. 2011, 94: 259-295. doi:10.1016/j.pneurobio.2011.05.003
- Ma, L.Y., Zhang, D.M., Tang, Y., Lu, Y., Zhang, Y., Gao, Y., Xia, L., Zhao, K.X., Chai, L.Y., Xiao, Q. Ghrelin-attenuated cognitive dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats. *Alzheimer Disease & Associated Disorders*. 2011, 25(4), 352-363. doi: 10.1097/WAD.0b013e31820ce536
- Ma, L., Shao, Z., Wang, R., Zhao, Z., Zhang, X., Ji, Z., Sheng, S., Xu, B., Dong, W., Zhang, J. The β -amyloid precursor protein analog P165 improves impaired insulin signal transduction in type 2 diabetic rats. *Neurological Sciences*. 2015, 36(4): 593-598. <https://doi.org/10.1007/s10072-014-1997-9>
- Maahs, D.M., West, N.A., Lawrence, J.M., Mayer-Davis, E.J. Epidemiology of type 1 diabetes. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*. 2010, 39(3): 481–497. doi:10.1016/j.ecl.2010.05.011

Mantamadiotis, T., Lemberger, T., Bleckmann, S.C., Kern, H., Kretz, O., Villalba, A.M., Tronche, F., Kellendonk, C., Gau, D., Kapfhammer, J., Otto, C., Schmid, W., Schütz, G. Disruption of CREB function in brain leads to neurodegeneration. *Nature genetics*. 2002, 31(1): 47-54. <https://doi.org/10.1038/ng882>

Marfella, R., Di Filippo, C., Esposito, K., Nappo, F., Piegari, E., Cuzzocrea, S., Berrino, L., Rossi, F., Giugliano, D., D'Amico, M. Absence of Inducible Nitric Oxide Synthase Reduces Myocardial Damage during Ischemia Reperfusion in Streptozotocin-Induced Hyperglycemic Mice. *Diabetes*. 2004 53(2): 454–462.

Marshall, C.B., Nishikawa, T., Osawa, M., Stathopoulos, P.B., Ikura, M. Calmodulin and STIM proteins: Two major calcium sensors in the cytoplasm and endoplasmic reticulum. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2015, 460(1): 5-21. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.01.106>

Mayr, B., Montminy, M. Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2001, 2(8): 599-609. <https://doi.org/10.1038/35085068>

Mbiantcha, M., Khalid, R., Dawe, A., Mehreen, A., Atsamo, D.A., Ateufack, G., Hamza, D., Nana, W.Y., Bomba, F.T.D., Naeem, R.U., Izhar, A. Antihypernociceptive and neuroprotective effects of Combretin A and Combretin B on streptozotocin-induced diabetic neuropathy in mice. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*. 2019, 392(6): 697-713. <https://doi.org/10.1007/s00210-019-01626-1>

McEwen, B.S. Protective and damaging effects of stress mediators: central role of the brain. *Dialogues in Clinical Neuroscience*. 2006, 8(4): 367–381.

Miao, Y., He, T., Zhu, Y., Li, W., Wang, B., Zhong, Y. Activation of hippocampal CREB by rolipram partially recovers balance between TNF- α and IL-10 levels and improves cognitive deficits in diabetic rats. *Cellular and molecular neurobiology*. 2015, 35(8): 1157-1164. <https://doi.org/10.1007/s10571-015-0209-3>

Michalak A., Wnorowski, A., Berardinelli, A., Zinato, S., Rusinek., J., Budzynska, B. Diazepam and SL-327 synergistically attenuate anxiety-like behaviours in mice – Possible hippocampal MAPKs specificity. *Neuropharmacology*. 2020, 180: 108302. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2020.108302>

Micheau, J., Riedelb, G. Protein kinases: which one is the memory molecule? *Cell. Mol. Life Sci*. 1999, 55: 534–548.

- Miyata, S., Saitoh, A., Hirano, S., Kamei, J. Effect of streptozotocin-induced diabetes on the function of the central nervous system in rodents. *Japanese Journal of Neuropsychopharmacology*. 2006, 26(2): 83 -87
- Miyata, S., Yamada, N., Hirano, S., Tanaka, S.I., Kameim, J. Diabetes attenuates psychological stress-elicited 5-HT secretion in the prefrontal cortex but not in the amygdala of mice. *Brain research*. 2007, 1147: 233-239. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.02.001>
- Mora Gallegos, A., Salas Castillo, S. Modelos animales de miedo y ansiedad: descripciones neuro-conductuales. *Actualidades en Psicología*. 2014, 28(117): 1–12.
- Moriguchi, S., Sakagami, H., Yabuki, Y., Sasaki, Y., Izumi, H., Zhang, C., Han, F., Fukunaga, K. Stimulation of Sigma-1 Receptor Ameliorates Depressive-like Behaviors in CaMKIV Null Mice. *Mol Neurobiol*. 2014. DOI 10.1007/s12035-014-8923-2
- Moriguchi, S., Sakagami, H., Yabuki, Y., Sasaki, Y., Izumi, H., Zhang, C., Han, F., Fukunaga, K. Stimulation of sigma-1 receptor ameliorates depressive-like behaviors in CaMKIV null mice. *Molecular neurobiology*. 2015, 52(3): 1210-1222. <https://doi.org/10.1007/s12035-014-8923-2>
- Mormède, P., Andanson, S., Aupérin, B., Beerda, B., Guémené, D., Malmkvist, J., Manteca, X., Manteuffel, G., Prunet, P., van Reenen, C.G., Richard, S., Veissier, I. Exploration of the hypothalamic–pituitary–adrenal function as a tool to evaluate animal welfare. *Physiology & Behavior*. 2007, 92: 317–339. doi:10.1016/j.physbeh.2006.12.003
- Morshedi, M., Valenlia, K.B., Hosseinfard, E.S., Shahabi, P., Abbasi, M.M., Ghorbani, M., Barzegari, A., Sadigh-Eteghad, S., Saghafi-Asl, M. Beneficial psychological effects of novel psychobiotics in diabetic rats: the interaction among the gut, blood, and amygdala. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 2018, 57, 1–26.
- Moser, E., Moser, M.B., Andersen, P. Spatial learning impairment parallels the magnitude of dorsal hippocampal lesions, but is hardly present following ventral lesions. *J. Neurosci*. 1993, 13, 3916–3925. doi: 10.1523/jneurosci.13-09-03916.1993
- Nadal, R., Armario, A..Mecanismos de susceptibilidad al estrés. *Hipertension y Riesgo Vascular*. 2010, 27(3): 117–124. <https://doi.org/10.1016/j.hipert.2009.05.008>
- Nadimi, H., Djazayery, A., Javanbakht, M.H., Dehpour, A., Ghaedi, E., Derakhshanian, H., Mohammadi, H., Mousavi, S.N., Djalali, M. Effect of Vitamin D supplementation on CREB-TrkB-BDNF pathway in the hippocampus of diabetic rats. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*. 2019, 23(1): 117–123. doi: 10.22038/IJBMS.2019.38170.9068

- Nakagomi, A., Okada, S., Yokoyama, M., Yoshida, Y., Shimizu, I., Miki, T., Kobayashi, Y., Minamino, T. Role of the central nervous system and adipose tissue BDNF/TrkB axes in metabolic regulation. *NPJ aging and mechanisms of disease*. 2015, 1(1): 1-11. doi:10.1038/npjamd.2015.9
- Nakamura, Y., Okuno, S., Sato, F., Fujisawa, H. An immunohistochemical study of Ca²⁺/Calmodulin-dependent protein kinase iv in the rat central nervous system: light and electron microscopic observations. *Neuroscience*. 1995, 68(1): 181-194.
- Nasrolahi, A., Mahmoudi, J., Noori-Zadeh, A., Haghani, K., Bakhtiyari, S., Darabi, S. Shared Pathological Mechanisms Between Diabetes Mellitus and Neurodegenerative Diseases. *Current Pharmacology Reports*. 2019, 5(4): 219-231. <https://doi.org/10.1007/s40495-019-00191-8>
- Nestler, E.J., Barrot, M., DiLeone, R.J., Eisch, A.J., Gold, S.J., Monteggia, L.M. Neurobiology of depression. *Neuron*. 2002, 34(1): 13-25. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(02\)00653-0](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(02)00653-0)
- Nitta, A., Murai, R., Suzuki, N., Ito, H., Nomoto, H., Katoh, G., Furukawa, Y., Furukawa, S. Diabetic neuropathies in brain are induced by deficiency of BDNF. *Neurotoxicology and Teratology*. 2002, 24(5): 695–701. [https://doi.org/10.1016/S0892-0362\(02\)00220-9](https://doi.org/10.1016/S0892-0362(02)00220-9)
- Northam, E.A., Rankins, D., Cameron, F.J. Therapy insight: the impact of type 1 diabetes on brain development and function. *Nature Clinical Practice Neurology*. 2006, 2(2): 78-86. <https://doi.org/10.1038/ncpneuro0097>
- Odeón, M.M., Romera, S.A. Estrés en ganado: causas y consecuencias. *Revista Veterinaria*. 2017, 28(1): 69–77.
- Ohl, F., Arndt, S.S., Van der Staay, F.J. Pathological anxiety in animals. *Veterinary Journal*. 2007, 1: 1–9.
- Pamidi, N., Satheesha Nayak B.N. Effect of streptozotocin induced diabetes on rat hippocampus. *Bratislavske lekarske listy*. 2012, 113(10): 583-588. doi:10.4149/BLL_2012_130
- Panaitescu, A.M., Popescu, M.R., Ciobanu, A.M., Gica, N., Cimpoca-RaptisPregnancy, B.A. Complications Can Foreshadow Future Disease—Long-Term Outcomes of a Complicated Pregnancy. *Medicina*. 2021, 57, 1320. <https://doi.org/10.3390/medicina57121320>
- Pandey, S.C. The gene transcription factor cyclic AMP-responsive element binding protein: role in positive and negative affective states of alcohol addiction. *Pharmacology & Therapeutics*. 2004, 104(1): 47–58. doi:10.1016/j.pharmthera.2004.08.

- Patel, S.S., Ray, R., Sharma, A., Mehta, V., Katyal, A., Udayabanu, M. Antidepressant and anxiolytic like effects of *Urtica dioica* leaves in streptozotocin induced diabetic mice. *Metabolic Brain Disease*. 2018, 33(4): 1281–1292. <https://doi.org/10.1007/s11011-018-0243-1>
- Paxinos, G., Franklin, K.B.J. *The mouse brain in stereotaxic coordinates: hard cover edition*. Access Online via Elsevier. 2001.
- Pellow, S., Chopin, P., File, S.E., Briley, M. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods*. 1985, 14: 149-167. doi: 10.1016/0165-0270(85)90031-7
- Pikkarainen, M., Ronkko, S., Savander, V., Insausti, R., Pitkanen, A. Projections from the lateral, basal, and accessory basal nuclei of the amygdala to the hippocampal formation in rat. *Journal of comparative neurology*. 1999, 403: 229–260.
- Pitkanen, A., Pikkarainen, M., Nurminen, N., Ylinen, A. Reciprocal connections between the amygdala and the hippocampal formation, perirhinal cortex, and postrhinal cortex in rat. A review. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2000, 911: 369–391.
- Prut, L., Belzung, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *European Journal of Pharmacology*. 2003, 463(1–3): 3–33.
- Radley, J.J., Morrison, J.H. Repeated stress and structural plasticity in the brain. *Ageing Research Reviews*. 2005, 4(2): 271–287.
- Ramanathan, M., Jaiswal, A.K., Bhattacharya, S.K. Differential effects of diazepam on anxiety in streptozotocin induced diabetic and non-diabetic rats. *Psychopharmacology*. 1998, 135: 361-367. <https://doi.org/10.1007/s002130050523>
- Reagan, L.P., Grillo, C.A., Piroli, G.G. The As and Ds of stress: Metabolic, morphological and behavioral consequences. *European Journal of Pharmacology*. 2008, 585(1), 64–75.
- Reagan, L.P. Diabetes as a chronic metabolic stressor: Causes, consequences and clinical complications. *Experimental Neurology*. 2012, 233(1), 68–78.
- Rebai, R., Jasmin, L., Boudah, A. The antidepressant effect of melatonin and fluoxetine in diabetic rats is associated with a reduction of the oxidative stress in the prefrontal and hippocampal cortices. *Brain research bulletin*. 2017, 134: 142-150. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2017.07.013>
- Redivo, D.D., Schreiber, A.K., Adami, E.R., Ribeiro, D.E., Joca, S.R., Zanoveli, J.M., Cunha, J. M. Effect of omega-3 polyunsaturated fatty acid treatment over mechanical allodynia and

depressive-like behavior associated with experimental diabetes. *Behavioural brain research*. 2016, 298: 57-64. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.10.058>

Revsin, Y., Rekers, N.V., Louwe, M.C., Saravia, F.E., De Nicola, A.F., De Kloet, E.R., Oitzl, M.S. Glucocorticoid receptor blockade normalizes hippocampal alterations and cognitive impairment in streptozotocin-induced type 1 diabetes mice. *Neuropsychopharmacology*. 2008, 34(3): 1-125.

Ribar, T.J., Rodriguiz, R.M., Khiroug, L., Wetsel, W.C., Augustine, G.J., Means, A.R. Cerebellar defects in Ca²⁺/calmodulin kinase IV-deficient mice. *Journal of Neuroscience*. 2000, 20(22): RC107-RC107. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-22-j0004.2000>

Ripoli, C., Spinelli, M., Natale, F., Fusco, S., Grassi, C. Glucose overload inhibits glutamatergic synaptic transmission: a novel role for CREB-mediated regulation of synaptotagmins 2 and 4. *Front. Cell Dev. Biol.* 2020, 8:810. doi:10.3389/fcell.2020.00810

Risold, P.Y., Swanson, L.W. Structural Evidence for Functional Domains in the Rat Hippocampus. *Science*. 1996, 272(5267): 1484–1486. doi:10.1126/science.272.5267.1484

Robinson, D.J., Coons, M. Haensel, H., Vallis, M., Yale, J.F. Diabetes and mental health. *Canadian journal of diabetes*. 2018, 42: S130-S141. <https://doi.org/10.1016/j.jcjd.2017.10.031>

Rosen, J.B., Schulkin, J. From normal fear to pathological anxiety. *Psychological Review*. 1998, 105(2): 325–350.

Ruberte, J., Carretero, A., Navarro, M. Morphological mouse phenotyping: anatomy, histology and imaging. Elsevier. 2017.

Rubler, S., Dlugash, J., Yuceoglu, Y.Z., Kumral, T., Branwood, A.W., Grishman, A. A new type of cardiomyopathy associated with diabetic glomerulosclerosis. *The American Journal of Cardiology*. 1972, 30: 595-602. doi:10.1016/0002-9149(72)90595-4

Ruggiero, R.N., Rossignoli, M.T., Marques, D.B., de Sousa, B.M., Romcy-Pereira, R.N., Lopes-Aguiar, C., Leite, J.P. Neuromodulation of Hippocampal-Prefrontal Cortical Synaptic Plasticity and Functional Connectivity: Implications for Neuropsychiatric Disorders. *Front. Cell. Neurosci.* 2021, 15: 732360. doi: 10.3389/fncel.2021.732360

Sakagami, H., Watanabe, M., Kondo, H. Gene expression of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase of the cerebellar granule cell type or type IV in the mature and developing rat brain. *Molecular Brain Research*. 1992, 16: 20-28.

Santoro, A., McGraw, T.E., Kahn, B.B. Insulin action in adipocytes, adipose remodeling, and systemic effects. *Cell Metabolism*. 2021, 33: 748-757. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2021.03.019>

Sapolsky, R.M., Krey, L.C., McEwen, B.S. Glucocorticoid-sensitive hippocampal neurons are involved in terminating the adrenocortical stress response. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1984, 81(19): 6174–6177. doi:10.1073/pnas.81.19.6174

Sapolsky, R.M. Social status and health in humans and other animals. *Annual Review of Anthropology*. 2004, 33: 393-418.

Saravia, F., Revsin, Y., Lux-Lantos, V., Beauquis, J., Homo-Delarche, F., De Nicola, A.F. Oestradiol restores cell proliferation in dentate gyrus and subventricular zone of streptozotocin-diabetic mice. *Journal of neuroendocrinology*. 2004, 16(8): 704-710. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2004.01223.x>

Schein, P.S. 1-Methyl-1-nitrosourea depression of brain nicotinamide adenine dinucleotide in the production of neurologic toxicity. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 1969, 131(2): 517-520. <https://doi.org/10.3181/00379727-131-33914>

Sestakova, N., Puzserova, A., Kluknavsky, M., Bernatova, I. Determination of motor activity and anxiety-related behaviour in rodents: methodological aspects and role of nitric oxide. *Interdisciplinary Toxicology*. 2013, 6(3): 126–135.

Shaywitz, A.J., Greenberg, M.E. CREB: A stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. *Annual Review of Biochemistry*. 1999, 68: 821–861. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.68.1.821>

Shen, X., Valencia, C.A., Szostak, J.W., Dong, B., Liu, R. Scanning the human proteome for calmodulin-binding proteins. *PNAS*. 2005, 102(17): 5969–5974.

Sheng, M., Thompson, M.A., Greenberg, M.E. CREB: a Ca²⁺- regulated transcription factor phosphorylated by calmodulin-independent kinase. *Science*. 1991, 252: 1427–1430.

Shin, Y.J., Chun, Y.T., Lim, S.W., Luo, K., Quan, Y., Cui, S., Ko, E.J., Chung, B.H., Lee, J., Hong, S., Lee, M.Y., Kang, H.G., Yang, C.W. Influence of tacrolimus on depressive-like behavior in diabetic rats through brain-derived neurotrophic factor regulation in the hippocampus. *Neurotoxicity Research*. 2019, 36(2): 396–410. <https://doi.org/10.1007/s12640-019-00062-6>

Shiomi, T., Tsutsui, H., Ikeuchi, M., Matsusaka, H., Hayashidani, S., Suematsu, N., Wen, J., Kubota, T., Takeshita, A. streptozotocin-induced hyperglycemia exacerbates left ventricular

remodeling and failure after experimental myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology*. 2003, 42(1): 165-172. doi:10.1016/S0735-1097(03)00509-6

Skelding, K.A., Rostas, J.A.P., Verrills, N.M. Controlling the cell cycle: The role of calcium/calmodulin-stimulated protein kinases I and II. *Cell Cycle*. 2011, 10(4): 631–639.

Smith, K.J., Béland, M., Clyde, M., Gariépy, G., Pagé, V., Badawi G., Rabasa-Lhoret, R., Schmitz, N. Association of diabetes with anxiety: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Psychosomatic Research*. 2013, 74: 89–99. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpsychores.2012.11.013>

Smith, M.A., Makino, S., Kvetnansky, R., Post, R.M. Stress and glucocorticoids affect the expression of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNAs in the hippocampus. *Journal of Neuroscience*. 1995, 15(3): 1768-1777. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.15-03-01768.1995>

Soderling, T.R. CaM-kinases: modulators of synaptic plasticity. *Current Opinion in Neurobiology*. 2000, 10(3), 375–380.

Sona, C., Kumar, A., Dogra, S., Kumar, B.A., Umrao, D., Yadav, P.N. Docosahexaenoic acid modulates brain-derived neurotrophic factor via GPR40 in the brain and alleviates diabetes-associated learning and memory deficits in mice. *Neurobiology of disease*. 2018, 118: 94-107. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2018.07.002>

Song, N., Nakagawa, S., Izumi, T., Toda, H., Kato, A., Boku, S., Inoue, T., Sakagami, H., Li, X., Koyama, T. Involvement of CaMKIV in neurogenic effect with chronic fluoxetine treatment. *International Journal of Neuropsychopharmacology*. 2013, 16(4): 803–812.

Stranahan, A.M., Arumugam, T.V., Cutler, R.G., Lee, K., Egan, J.M., Mattson, M.P. Diabetes impairs hippocampal function through glucocorticoid-mediated effects on new and mature neurons. *Nature Neuroscience*. 2008, 11(3): 309–317.

Stranahan, A.M., Arumugam, T.V., Mattson, M.P. Lowering corticosterone levels reinstates hippocampal brain-derived neurotrophic factor and Trkb expression without influencing deficits in hypothalamic brain-derived neurotrophic factor expression in leptin receptor-deficient mice. *Neuroendocrinology*. 2011, 93(1): 58-64. <https://doi.org/10.1159/000322808>

Suarez, S.D., Gallup, Jr., G.G. An Ethological Analysis of Open-Field Behavior in Rats and Mice. *Learning and Motivation*. 1981, 12: 342-363.

Suenaga, T., Morinobu, S., Kawano, K., Sawada, T., Yamawaki, S. Influence of immobilization stress on the levels of CaMKII and phospho-CaMKII in the rat hippocampus. *International*

Journal of Neuropsychopharmacology. 2004, 7: 299–309. DOI : 10.1017/S1461145704004304

Sulaiman, M., Matta, M.J., Sunderesan, N.R., Gupta, M.P., Periasamy, M., Gupta, M. Resveratrol, an activator of SIRT1, upregulates sarcoplasmic calcium ATPase and improves cardiac function in diabetic cardiomyopathy. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2010; 298: 833-843. doi:10.1152/ajpheart.00418.2009.

Sun, P., Enslin, H., Myung, P.S., Maurer, R.A. Differential activation of CREB by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinases type II and type IV involves phosphorylation of a site that negatively regulates activity. *Genes & development.* 1994, 8(21): 2527-2539. doi:10.1101/gad.8.21.2527

Swulius, M.T., Waxham, M.N. Ca²⁺/Calmodulin-dependent protein kinases. *Cellular and Molecular Life Sciences.* 2008, 65(17): 2637–2657.

Sylow, L., Tokarz, V.L., Richter, E.A., Klip, A. The many actions of insulin in skeletal muscle, the paramount tissue determining glycemia. *Cell Metabolism.* 2021, 33: 758-779. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2021.03.020>

Takemoto-Kimura, S., Suzuki, K., Horigane, S.I., Kamijo, S., Inoue, M., Sakamoto, M., Fujii, H., Bito, H. Calmodulin kinases: essential regulators in health and disease. *Journal of Neurochemistry.* 2017, 141(6): 808–818. doi: 10.1111/jnc.14020

Tang, S.S., Ren, Y., Xu, L.J., Cao, J.R., Hong, H., Ji, H., Hu, Q.H. Activation of ER α and/or ER β ameliorates cognitive impairment and apoptosis in streptozotocin-induced diabetic mice. *Hormones and Behavior.* 2018, 105: 95–103. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2018.08.002>

Tang, Q., Chen, S., Wu, H., Song, H., Wang, Y., Shi, J., Wu, Y. Congenital hypothyroidism impairs spine growth of dentate granule cells by downregulation of CaMKIV. *Cell Death Discovery.* 2021, 7:143. <https://doi.org/10.1038/s41420-021-00530-z>

Tao, X., Finkbeiner, S., Arnold, D.B., Shaywitz, A.J., Greenberg, M.E. Ca²⁺ Influx Regulates BDNF Transcription by a CREB Family Transcription Factor-Dependent Mechanism. *Neuron.* 1998, 20: 709–726

Tardito, D., Musazzi, L., Tiraboschi, E., Mallei, A., Racagni, G., Popoli, M. Early induction of CREB activation and CREB-regulating signalling by antidepressants. *International Journal of Neuropsychopharmacology.* 2009, 12: 1367–1381. doi:10.1017/S1461145709000376

Thapak, P., Bishnoib, M., Sharma, S.S. Amelioration of diabetes-induced cognitive impairment by Transient Receptor Potential Vanilloid 2 (TRPV2) channel inhibitor: Behavioral and

mechanistic study. *Neurochemistry International*. 2020, 139: 104783. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2020.104783>

Thoenen, H. Neurotrophins and neuronal plasticity. *Science*. 1995, 270(5236): 593-598. doi: 10.1126/science.270.5236.593

Tilbrook, A.J., Clarke, I.J. Neuroendocrine mechanisms of innate states of attenuated responsiveness of the hypothalamo-pituitary adrenal axis to stress. *Frontiers in Neuroendocrinology*. 2006, 27: 285–307. doi:10.1016/j.yfrne.2006.06.002

Tiraboschi, E., Giambelli, R., D'Urso, G., Galletta, A., Barbon, A., de Bartolomeis, A., Gennarelli, M., Barlati, S., Racagni, G., Popoli, M. Antidepressants activate CaMKII in neuron cell body by Thr286 phosphorylation. *Neuropharmacology and Neurotoxicology*. 2004a, 15(15): 2393-2396.

Tiraboschi, E., Tardito, D., Kasahara, J., Moraschi, S., Pruneri, P., Gennarelli, M., Racagni, G., Popoli, M. Selective phosphorylation of nuclear CREB by fluoxetine is linked to activation of CaM kinase IV and MAP kinase cascades. *Neuropsychopharmacology*. 2004b, 29(10): 1831–1840. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300488>

Tokumitsu, H., Enslin, H., Soderling, T.R. Characterization of a Ca²⁺/Calmodulin-dependent protein kinase cascade: Molecular cloning and expression of Calcium/Calmodulin-dependent protein kinase kinase. *Journal of Biological Chemistry*. 1995, 270(33): 19320–19324.

Tokumitsu, H., Soderling, T.R. Requirements for Calcium and Calmodulin in the Calmodulin Kinase Activation Cascade. *Journal of Biological Chemistry*. 1996, 271(10): 5617–5622. doi:10.1074/jbc.271.10.5617

Tran, L., Keele, N.B. CaMKII alpha Knockdown Decreases Anxiety in the Open Field and Low Serotonin-Induced Upregulation of GluA1 in the Basolateral Amygdala. *Behavioural Brain Research*. 2016, 303: 152-159. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2016.01.053>

Treuting, P.M., Dintzis, S., Montine, K. S. (Eds.). *Comparative anatomy and histology: a mouse, rat, and human atlas*. Academic Press. 2017.

Trost, S.U., Belke, D.D., Bluhm, W.F., Meyer, M., Swanson, E., Dillmann, W.H. Overexpression of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase improves myocardial contractility in diabetic cardiomyopathy. *Diabetes*. 2002, 51:1166-1171.

Tsafack, E.G., Mbiantcha, M., Ateufack, G., Djuichou Nguemngang, S.F., Nana Yousseu, W., Atsamo, A.D., Mba, V.M.M., Adjouzem, C.F., Ben Besong, E. Antihypernociceptive and Neuroprotective Effects of the Aqueous and Methanol Stem-Bark Extracts of *Nauclea*

pobeguunii (Rubiaceae) on STZ-Induced Diabetic Neuropathic Pain. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2021, 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/6637584>

Ulrich-Lai, Y.M., Herman, J.P. Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nature Reviews Neuroscience*. 2009, 10(6): 397–409.

Valverde, O., Mantamadiotis, T., Torrecilla, M., Ugedo, L., Pineda, J., Bleckmann, S., Gass, P., Kretz, O., Mitchell, J.M., Schutz, G., Maldonado, R., Modulation of Anxiety-Like Behavior and Morphine Dependence in CREB-Deficient Mice. *Neuropsychopharmacology*. 2004, 29: 1122–1133. doi:10.1038/sj.npp.1300416

Van Groen, T., Wyss, J.M. Extrinsic projections from area CA1 of the rat hippocampus: Olfactory, cortical, subcortical, and bilateral hippocampal formation projections. *J. Comp. Neurol*. 1990, 302 515–528. doi: 10.1002/cne. 903020308

Villeneuve, L.M., Reddy, M.A. Natarajan, R. Epigenetics: deciphering its role in diabetes and its chronic complications. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol*. 2011, 38(7): 401-409. doi:10.1111/j.1440-1681.2011.05497.x

Waddingham, M.T., Edgley, A.J., Tsuchimochi, H., Kelly, D.J., Shirai, M., Pearson, J.T. Contractile apparatus dysfunction early in the pathophysiology of diabetic cardiomyopathy. *World J. Diabetes*. 2015, 6(7): 943-960. doi:10.4239/wjd.v6.i7.943

Wadzinski, B.E., Wheat, W.H., Jaspers, S., Peruski, L.F., Ronald, JR., Lickteig, L., Johnson, G.L., Klemm, D.J. Nuclear Protein Phosphatase 2A Dephosphorylates Protein Kinase A-Phosphorylated CREB and Regulates CREB Transcriptional Stimulation. *Molecular and Cellular Biology*. 1993, 13(5): 2822-2834.

Wang, J.W., David, D.J., Monckton, J.E., Battaglia, F., Hen, R. Chronic fluoxetine stimulates maturation and synaptic plasticity of adult-born hippocampal granule cells. *Journal of Neuroscience*. 2008, 28(6): 1374-1384. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3632-07.2008>

Wang, J., Duan, P., Cui, Y., Li, Q., Shi, Y. Geniposide alleviates depression-like behavior via enhancing BDNF expression in hippocampus of streptozotocin-evoked mice. *Metabolic Brain Disease*. 2016, 31(5): 1113–1122. <https://doi.org/10.1007/s11011-016-9856-4>

Wayman, G.A., Lee, Y.S., Tokumitsu, H., Silva, A., Soderling, T.R. Calmodulin-Kinases: modulators of neuronal development and plasticity. *Neuron*. 2008, 59(6): 914–931.

West, A.E., Griffith, E.C., Greenberg, M.E. Regulation of transcription factors by neuronal activity. *Nat. Rev. Neurosci*. 2002, 3: 921–931.

Witter, M. Hippocampus. En *The mouse nervous system*. Academic Press. 2012, 112-139.

- Wu, G.Y., Deisseroth, K., Tsien, R.W. Activity-dependent CREB phosphorylation: convergence of a fast, sensitive calmodulin kinase pathway and a slow, less sensitive mitogen-activated protein kinase pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2001, 98(5): 2808-2813. <https://doi.org/10.1073/pnas.051634198>
- Wu, L.J., Kim, S.S, Zhuo, M. Molecular Targets of Anxiety: From Membrane to Nucleus. *Neurochem Res*. 2008, 33: 1925–1932. <https://doi.org/10.1007/s11064-008-9679-8>
- Wu, Y., Wu, C., Ye, L., Wang, B., Yuan, Y., Liu, Y., Zheng, P., Xiong, J., Li, Y., Jiang, T., Li, X., Xiao, J. Exogenous fibroblast growth factor 1 ameliorates diabetes-induced cognitive decline via coordinately regulating PI3K/AKT signaling and PERK signaling. *Cell Communication and Signaling*. 2020, 18: 1-15. <https://doi.org/10.1186/s12964-020-00588-9>
- Yang, A.J., Frendo-Cumbo, S., MacPherson, R.E. Resveratrol and metformin recover prefrontal cortex AMPK activation in diet-induced obese mice but reduce BDNF and synaptophysin protein content. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2019, 71(3): 945-956. doi: 10.3233/JAD-190123
- Yang, E., Gavini, K., Bhakta, A., Dhanasekaran, M., Khan, I., Parameshwaran, K. Streptozotocin induced hyperglycemia stimulates molecular signaling that promotes cell cycle reentry in mouse hippocampus. *Life Sciences*. 2018, 205: 131–135.
- Yuan, P., Zhang, J., Li, L., Song, Z. Fluoxetine attenuated anxiety-like behaviors in streptozotocin-induced diabetic mice by mitigating the inflammation. *Mediators of inflammation*. 2019, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/4315038>
- Zborowski, V.A., Heck, S.O., Sari, M.H., Bastos, N.K., Neto, J.S., Nogueira, C.W. (p-CIPhSe) 2 modulates hippocampal BDNF/TrkB signaling and reverses memory impairment induced by diabetes in mice. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 2019, 94: 109660. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2019.109660>
- Zhuravliova, E., Barbakadze, T., Narmania, N., Sepashvili, M., Mikeladze, D.G. Hypoinsulinemia alleviates the GRF1/Ras/Akt anti-apoptotic pathway and induces alterations of mitochondrial ras trafficking in neuronal cells. *Neurochemical research*. 2009, 34(6): 1076-1082. <https://doi.org/10.1007/s11064-008-9877-4>