



Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas
PEDECIBA
Área BIOLOGIA
Sub-área Neurociencias

“Efectos de la administración intracerebral aguda y crónica de la hormona concentradora de melanina sobre la memoria y sus efectos en un modelo animal de enfermedad de Alzheimer”

MSc. Vicente Ruiz Viroga

Orientadora: Dra. Patricia Lagos
Co-orientador: Dr. Pablo Galeano

Laboratorio de Neurotransmisión peptídica
Unidad Académica de Fisiología
Facultad de Medicina
Universidad de la República
Montevideo
URUGUAY
2023

INDICE

Contenido

1. INTRODUCCIÓN	10
1.1. Memoria	10
1.2. Neurotransmisores en el hipocampo y neuroplasticidad	11
1.3. Memoria y hormona concentradora de melanina	13
1.4. Memoria y Enfermedad de Alzheimer	19
1.5. Estreptozotocina intracerebroventricular: un modelo esporádico de EA	20
2. HIPÓTESIS	22
3. OBJETIVO GENERAL	22
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
5. METODOLOGÍA	24
5.1. Drogas, insumos y reactivos utilizados	24
5.2. Animales.....	24
5.3. Pruebas comportamentales	24
5.3.1. Prueba de reconocimiento de Objeto Novedoso	25
5.3.2. Laberinto en Cruz Elevado modificado	28
5.4. Puesta a punto de las pruebas comportamentales	29
5.4.1. Puesta a punto de la prueba NORT	29
5.5. Objetivo específico 1: Efectos de la administración aguda intra-hipocampal de MCH	30
Para evaluar los efectos del tratamiento agudo intra-hipocampal de MCH se aplicaron los siguientes grupos experimentales:	30
5.6. Objetivo específico 2: Administración intra-hipocampal aguda de ATC-0175 y MCH.....	33
5.7. Objetivo específico 3: PCR y western-blot	33
5.8. Objetivo específico 4: administración crónica i.c.v. de MCH o vehículo	37
5.8.1. Armado de microbombas y cirugía estereotáxica.....	37
5.8.1.2. Implantación de microbombas	38
5.9. Análisis estadístico	42
6. RESULTADOS	43
6.1. Puesta a punto de las pruebas comportamentales	43
6.1.1. Puesta a punto de la prueba NORT	43
6.1.2. Puesta a punto de la prueba LCEm	46
6.2. Efectos del tratamiento agudo con MCH intra-hipocampal	47
6.3. Tratamiento agudo con MCH intra-hipocampal	49
6.3.1. Efectos en el NORT	49
6.3.2. Efectos en el LCEm	53

6.3.3. Localización de cánulas	56
6.4. Co-administración intra-hipocampal aguda de un antagonista de los MCHR-1 y MCH a 200 ng: efectos sobre la prueba NORT	57
6.5. Efectos del tratamiento agudo intra-hipocampal sobre la expresión de marcadores del sistema glutamatérgico, BDNF, TrkB y MCHR-1	60
6.6. Tratamiento crónico i.c.v. con MCH o vehículo aplicado al modelo de EA por administración i.c.v. de estreptozotocina	65
7. DISCUSIÓN	70
7.1. Puesta a punto de las pruebas comportamentales	70
7.2. Tratamiento intra-hipocampal agudo con MCH	71
7.3. Tratamiento i.c.v. crónico con MCH	82
8. CONCLUSIONES.....	92
9. PERSPECTIVAS.....	93
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94

ABREVIATURAS

Actb: *actin beta*

ACh: acetilcolina

AMPA: del inglés, *α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid*

APP: del inglés, *amyloid- β Precursor Protein*

BDNF: factor neurotrófico derivado del cerebro

CA: Campo Abierto

EA: Enfermedad de Alzheimer

EM: ensayo de muestra

ER: ensayo de retención

GABA: ácido γ -butírico

GFAP: proteína ácida fibrilar glial

GPCR: del inglés, *G-protein coupled receptor*

Grin: *Glutamate [NMDA] receptor subunit*

HLA: Hipotálamo Lateral

i.c.v.: intracerebroventricular

i.p.: intraperitoneal

ITI: intervalo inter-ensayo

LCEm: Laberinto en Cruz Elevado modificado

LCR: Líquido Cefalorraquídeo

LCRa: Líquido Cefalorraquídeo artificial

LT: Latencia de Transferencia

LTD: del inglés, *Long-term Depression*

LTP: del inglés, *Long-term Potentiation*

MB: microbomba

MCH: del inglés, *Melanin Concentrating Hormone*

MCHR-1: del inglés, *Melanin Concentrating Hormone Receptor-1*

NAc: *nucleo accumbens*

NDR: Núcleo Dorsal del Rafe

NMDA: del inglés, *N-methyl-d-aspartic acid or N-methyl-d-aspartate*

NMDAR: del inglés, *N-methyl-d-aspartic acid or N-methyl-d-aspartate receptor*

NORT: del inglés, *Novel Object Recognition Task*

NPY: neuropéptido Y

NSL: Núcleo Septolateral

PSEN: presenilina

SNC: Sistema Nervioso Central

STZ: estreptozotocina

TrkB: del inglés, *Tropomyosin receptor kinase B*

ZI: zona incerta

RESUMEN

La memoria se entiende como los procesos encargados de codificar, almacenar y recuperar información adquirida a través de la experiencia. Numerosas estructuras participan en dichos procesos, siendo el hipocampo una de las que más se destaca. Dicha estructura se encuentra densamente inervada por fibras capaces de liberar neuropéptidos como es la hormona concentradora de melanina (MCH). Este neuropéptido hipotalámico es capaz de modular la actividad neuronal dentro del hipocampo, facilitando fenómenos de plasticidad sináptica. Tanto estos procesos como el hipocampo en sí, se ven particularmente afectados en la enfermedad de Alzheimer (EA), patología donde se observa un deterioro progresivo de las funciones cognitivas. Esta enfermedad se caracteriza por la acumulación del péptido beta-amiloide en forma de placas extracelulares y la formación de ovillos neurofibrilares como consecuencia de la hiperfosforilación de la proteína tau. La EA se presenta en dos formas: una forma familiar (genética) y una forma esporádica más frecuente en la clínica. Diversos modelos animales se han empleado para el estudio de los fenómenos fisiopatológicos que destacan a la enfermedad de Alzheimer. Uno de ellos es el modelo de inyección intracerebroventricular (i.c.v.) de estreptozotocina (STZ). Esta droga, al ser administrada por vía intracerebral induce una “diabetes tipo III” afectando el metabolismo de la glucosa en el cerebro. En dicho modelo, los déficits cognitivos y morfológicos se manifiestan en una fase aguda 30 días luego de la administración de STZ. Este modelo intervencionista es capaz de reproducir algunas de las alteraciones cognitivas y los cambios morfológicos observados en pacientes con EA. Estudios previos han demostrado la capacidad de un tratamiento agudo de MCH intracerebral en potenciar la consolidación de la memoria a través de la facilitación de procesos de Potenciación a Largo Plazo (LTP) y evidenciado en pruebas comportamentales que evalúan procesos de memoria. Si bien se conocen los efectos de la MCH y sus propiedades moduladoras de la memoria, existen escasos trabajos que estudien la capacidad de la MCH de potenciar la memoria y el aprendizaje en modelos de EA. En el presente trabajo de tesis, nos propusimos estudiar los efectos de la administración aguda de MCH intra-hipocampal como favorecedora de procesos mnémicos a nivel comportamental y molecular. Por otra parte, se estudió la capacidad de la MCH administrada de forma crónica de atenuar los déficits cognitivos, en el modelo de EA inducido por STZ. Para evaluar los efectos de la MCH sobre procesos comportamentales y cognitivos se emplearon las siguientes pruebas: la tarea de

reconocimiento de objeto novedoso (NORT) y Laberinto en Cruz Elevado modificado (LCEm). Los resultados obtenidos evidenciaron efectos amnésicos de la MCH aguda intra-hipocampal los cuales actúan de forma dosis-dependiente y que son bloqueados con la aplicación de un antagonista para el receptor MCHR-1 de la MCH demostrando vínculo entre dicho neuropéptido y la memoria. También demostramos que dicho tratamiento repercute sobre la expresión hipocampal del receptor del factor neurotrófico BDNF: el TrkB. También evidenciamos utilizando la prueba de NORT que el tratamiento crónico con MCH favorece la retención de memoria en condiciones patológicas como las inducidas tras el tratamiento con STZ.

La presente tesis de Doctorado pone en evidencia el rol directo de la MCH sobre la modulación de la memoria y que sus efectos pueden variar frente a condiciones basales o patológicas.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Memoria

Se entiende por memoria a la capacidad de codificar, almacenar y evocar recuerdos. La memoria y el aprendizaje son funciones esenciales para la supervivencia del individuo, permitiéndole adaptarse a un ambiente variable (Bird, 2017; Brockmeier, 2010; Joshi y cols., 2019).

La memoria puede clasificarse atendiendo a diferentes criterios. Desde un punto de vista cualitativo se distingue una memoria declarativa y una no-declarativa (Bird, 2017). La primera, también conocida como memoria explícita, hace referencia al almacenamiento y evocación de información a nivel consciente, y que puede expresarse con palabras (Zola-Morgan & Squire, 1993). Por ejemplo, información sobre hechos fácticos y/o eventos pasados, por ejemplo, permitiendo el reconocimiento de lugares, personas, etc. Por otro lado, la memoria no declarativa o memoria implícita abarca secuencias sensoriales y/o motoras, sin acceso a la conciencia, que permiten la realización de tareas específicas. Esta memoria recibe influencia de experiencias pasadas que condicionan la velocidad y precisión con la que se realizan diversas tareas (Zola-Morgan & Squire, 1993). Ambos tipos de memoria dependen de regiones anatómicas específicas. Así, el lóbulo temporal medial, la corteza prefrontal y el diencefalo son cruciales para el procesamiento de la memoria declarativa mientras que el estriado, el neocórtex, la amígdala y el cerebelo, entre otras estructuras, actúan como soporte anatómico de la memoria no-declarativa (Bird & Burgess, 2008; Borbély y cols., 2013; Opitz, 2014).

La memoria también puede clasificarse desde un punto de vista temporal en memoria a corto plazo (del orden de segundos, minutos u horas) o a largo plazo (del orden de semanas, meses o años). La discriminación de estos dos tipos de memorias ha llevado a pensar que las nuevas memorias se almacenan de forma lábil y se consolidan gradualmente con el tiempo (Balderas y cols., 2015; Sara, 2000).

Ambos tipos de memoria dependen de regiones anatómicas específicas. La memoria declarativa se procesa en el diencefalo, el prosencefalo basal y el lóbulo medio-temporal, siendo la porción más importante de este último el hipocampo, además de en áreas corticales adyacentes como la corteza entorrinal, perirrinal y corteza para-hipocampal (Bird & Burgess, 2008; Borbély y cols., 2013; Zola-Morgan & Squire, 1993). y recibe aferencias de diversos núcleos del sistema nervioso central (SNC). Por otro lado, el prosencefalo basal, formado por

el núcleo septomedial, entre otros, es una de las principales fuentes de aferencias colinérgicas al hipocampo (Borbély y cols., 2013; Kanoski & Grill, 2017).

Particularmente, el hipocampo representa una estructura crucial para la memoria episódica, vinculada a funciones como el reconocimiento de características asociadas los episodios que es capaz de evocar (França & Monserrat, 2018).

1.2. Neurotransmisores en el hipocampo y neuroplasticidad

El hipocampo se encuentra en conexión con la corteza cerebral a través de la corteza entorrinal. Diversas aferencias que llegan al hipocampo colaboran con los procesos de formación de memorias y su almacenamiento y evocación (Borbély y cols., 2013; Lima y cols., 2013). Dada su abundancia en el SNC, las principales son las aferencias glutamatérgicas y GABAérgicas recibiendo también aferencias de diversos núcleos del SNC (Chronister & White Jr., 1975; Shi y cols., 2023; Varas y cols., 2003). Aparte de los neurotransmisores mencionados anteriormente, otras aferencias como las colinérgicas y monoaminérgicas (por ejemplo, dopamina, serotonina y noradrenalina) se encuentran presentes en el hipocampo (Kanoski & Grill, 2017; Lima y cols., 2013; Schliebs & Arendt, 2011). Además de dichos neurotransmisores, también se ha descrito ampliamente la presencia de receptores para neuropéptidos en el hipocampo (Merighi y cols., 2011; Salio y cols., 2006). Entre los descritos se encuentran la ghrelina, el neuropéptido Y y la MCH (Adamantidis and de Lecea, 2009; Beck and Pourié, 2013).

Los mecanismos celulares y moleculares que subyacen a la formación, almacenamiento y evocación de memorias, consisten en la modificación a lo largo del tiempo de las conexiones sinápticas y las características electrofisiológicas de los circuitos neuronales (Carrillo-Reid, 2022; McGaugh y cols., 2016). Dichas alteraciones a nivel sináptico se conocen como fenómenos de plasticidad sináptica en los cuales, a través de la experiencia, la eficacia sináptica es modificada a corto y largo plazo (Bliss & Collingridge, 1993). Particularmente, la neurotransmisión glutamatérgica es protagonista de los fenómenos de plasticidad sináptica (Renner & Triller, 2013). El glutamato activa post-sinápticamente a los receptores AMPA, lo cual induce una despolarización gracias al flujo de iones de Na^+ hacia la post-sinapsis capaz de activar los receptores NMDA (también unidos a su ligando, el glutamato) (Argyrousi y cols., 2018). Dichos receptores se encuentran bloqueados por un ion de Mg^{2+} , el cual es desplazado por la despolarización, permitiendo un aumento del flujo de iones Ca^{2+} hacia la post-sinapsis

(Barnes y cols., 2020). A su vez, éste junto a otros segundos mensajeros como el cAMP y cGMP, actuará como segundo mensajero generando cambios bioquímicos en la neurona post-sináptica al estimular la expresión de factores de transcripción que inducen la formación o eliminación de espinas dendríticas y nuevas conexiones sinápticas (Ricciarelli and Fedele, 2018). Dichos mecanismos implican también cambios en la cantidad de receptores NMDA expresados en el circuito neuronal. Dichos cambios se deben, en parte, a que la cascada de segundos mensajeros inducidos por el aumento de Ca^{2+} a nivel post-sináptico es capaz de influir en la expresión de subunidades clave de los receptores NMDA, como son la subunidad NR1, NR2A-D y la NR3 (Cammarota y cols., 2000; Le Barillier y cols., 2017; Varas y cols., 2003). Estos cambios a nivel de los receptores glutamatérgicos NMDA son capaces de desencadenar los fenómenos de Potenciación a Largo Plazo (del inglés: *Long-Term Potentiation*, LTP) o Depresión a Largo Plazo (del inglés: *Long-Term Depression*, LTD). Ambos procesos subyacen el fenómeno de plasticidad neuronal y son esenciales para la formación y almacenamiento de nuevas memorias a lo largo del tiempo. Debido a su relevancia en la formación y almacenamiento de memoria, tanto el LTP como el LTD ha sido estudiado ampliamente en el hipocampo (Barker and Warburton, 2015; Bliss and Collingridge, 1993; Le Barillier y cols., 2017). Se sabe que existen otros factores capaces de estimular estas modificaciones neuronales capaces de facilitar la adquisición y consolidación de nuevas memorias. Uno de los más estudiados es la neurotrofina BDNF (del inglés, *Brain-derived Neurotrophic Factor*)(Bekinschtein y cols., 2014; Lu y cols., 2008). Esta neurotrofina es capaz de ejercer sus efectos principalmente a través de la interacción con el receptor transmembrana TrkB (del inglés, *Tropomyosin-related kinase B*)(Hempstead, 2015; Notaras and van den Buuse, 2019). Dicho receptor se ha visto vinculado en la activación de la cascada de señalización ERK, al crecimiento de las dendritas y al remodelado del citoesqueleto en astrocitos (Albini y cols., 2023; Notaras and van den Buuse, 2019). Debido a que el BDNF y su receptor se expresa a nivel hipocampal, dicha neurotrofina ha sido asociada a la función de formación de memorias (Bekinschtein y cols., 2014; Radiske y cols., 2017; Tang y cols., 2010).

1.3. Memoria y hormona concentradora de melanina

La MCH es un neuropéptido cíclico compuesto de 19 aminoácidos (mamíferos) cuyos núcleos de síntesis se ubican en el hipotálamo lateral (HL) y zona incerta (ZI), a partir de los cuales envían proyecciones MCHérgicas a diversas regiones del SNC entre las que se encuentran el bulbo olfatorio, la corteza cerebral, el hipocampo, el núcleo dorsal del rafe, entre otros (Fig. 1.) (Bittencourt y cols., 1992; Kawauchi y cols., 1983).

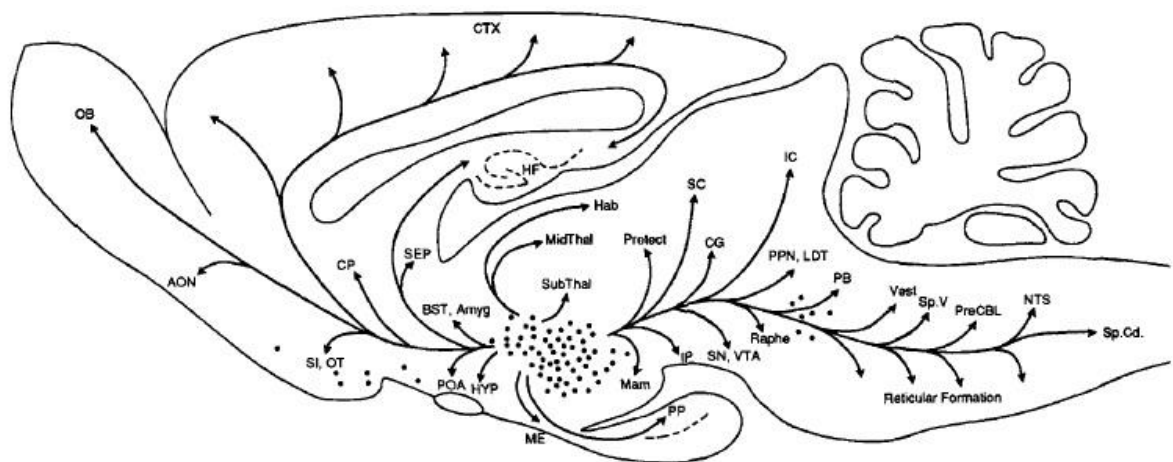


Fig. 1. Esquema sagital del cerebro de rata indicando la localización de neuronas MCHérgicas (puntos negros) y sus proyecciones. Abreviaciones: Amyg: amígdala; AON: núcleo olfatorio anterior; BST: núcleo basolateral de la amígdala; CG: sustancia gris central; CP: caudado-putamen; CTX: corteza cerebral; Hab: habenula; HF: formación hipocampal; HYP: hipotálamo; IC: colículo inferior; IP: núcleo interpeduncular; LDT: núcleo laterodorsal tegmental; ME: eminencia media; MidThal: núcleo talámico medial; Mam: complejo mamilar; NTS: núcleo del tracto solitario; OB: bulbo olfatorio; OT: tubérculo olfatorio; PB: núcleo parabrancial; POA: área preóptica; PP: pituitaria posterior; PPN: núcleo pedunculopontino; PreCBL: núcleo pre-cerebelar; SEP: complejo nuclear septal; SN: sustancia nigra; Sp. V: núcleo vestibuloespinal; Sp. Cd.: médula espinal; SubThal: región subtalámica; Vest: núcleo vestibular; VTA: área tegmental ventral (Tomado de Bittencourt y cols. 1992).

Los efectos de la MCH se dan a través de su interacción con dos receptores metabotrópicos del tipo acoplado a proteína G (GPCR, del inglés): MCHR-1 y MCHR-2, siendo el MCHR-1 el único receptor funcional en roedores (Hawes y cols., 2000; Saito y cols., 1999). Se ha descrito que aquellos sitios densamente inervados por fibras MCHérgicas también presentan un alto grado de expresión del ARNm codificante para el receptor MCHR-1 (Fig. 2.) (Hervieu y cols., 2000; Lembo y cols., 1999; Presse y cols., 2014). A nivel proteico, se ha evidenciado la presencia de la proteína del receptor MCHR-1 en las cilias primarias de

neuronas hipocampales de rata y ratón (Diniz y cols., 2020; Kobayashi y cols., 2021; Niño-Rivero y cols., 2019).

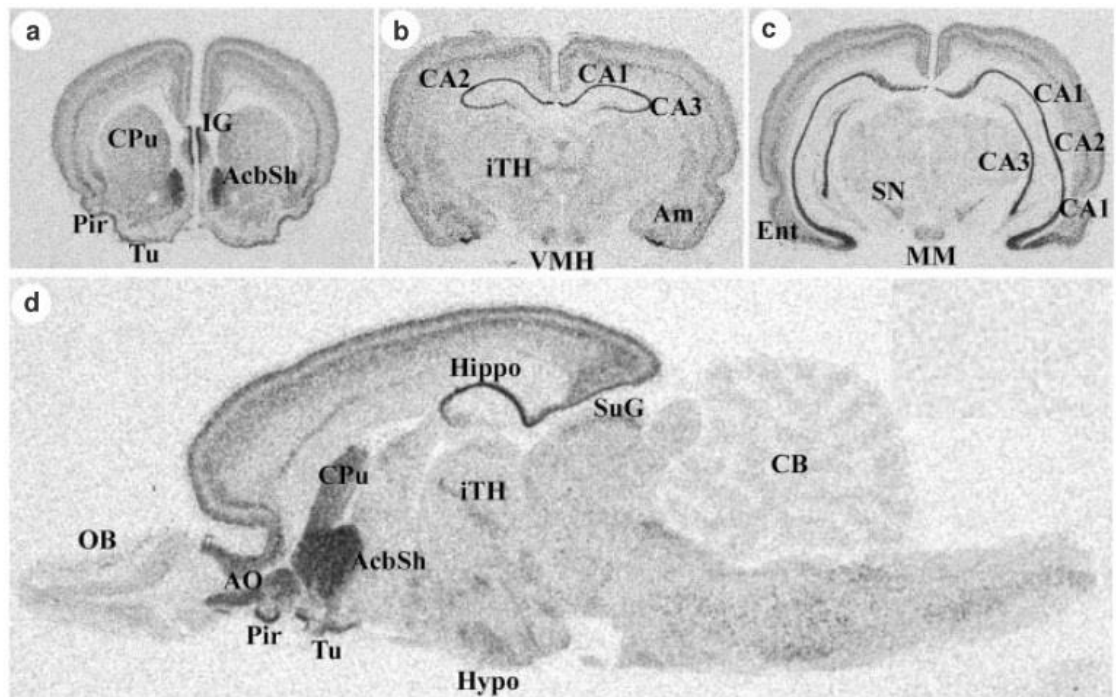


Fig. 2. Detección por hibridación *in situ* de expresión de ARNm para MCHR-1 en el cerebro de rata. A – C, cortes coronales representativos de la expresión del ARNm para MCHR-1 a distintos niveles en el eje rostrocaudal. D, corte sagital exhibiendo la distribución del ARNm para MCHR-1 en el cerebro de rata. AcbSh: Núcleo *accumbens Shell*; Am: Amígdala; AO: núcleo olfatorio anterior; CA1-3: regiones de Asta de *Ammon*; CB: cerebelo; CPu: Caudado-Putamen; Ent: corteza entorrinal; Hippo: hipocampo; Hypo: hipotálamo; IG: *indusium griseum*; iTH: Núcleo talámico interlaminar; MM: Núcleo mamilar; Pir: corteza piriforme; SuG: capa gris superficial del colículo superior; Tu: tubérculo olfatorio (Tomado y modificado de Lembo y cols. 1999).

Tras la unión con su receptor, la MCH es capaz de activar las cascadas de señalización $G_{i/o}$, las cuales al activarse disminuyen los niveles intracelulares de cAMP, fenómeno asociado a inhibición neuronal. Por otro lado, también es posible la activación de la vía G_q , la cual es capaz de aumentar los niveles intracelulares de Ca^{2+} , lo cual se asocia a una activación neuronal (Concetti y cols., 2024; X.-B. Gao, 2009). Es importante mencionar que muchos de estos procesos fueron llevados a cabo en modelos de cultivo de líneas celulares no neuronales. Gao y cols. (2002) han descrito que los efectos celulares de la MCH en rodajas de hipotálamo son principalmente inhibitorios, demostrando que la MCH actúa como un regulador de la liberación de GABA y glutamato, influyendo sobre la apertura de los canales de calcio voltaje-dependientes presentes en neuronas hipotalámicas (Gao, 2009, 2018; Gao & Pol, 2002). A

pesar de estas observaciones obtenidas de un preparado *in vitro* de rata, existen pocos estudios realizados en tejidos donde se exprese de forma endógena el receptor MCHR-1 que apoyen dichas observaciones con otras evidencias más contundentes y complementarias. También es sabido que las neuronas MCHérgicas también son capaces de liberar glutamato o GABA, lo cual se evidenció al identificar la presencia de la maquinaria sináptica participante de la liberación de dichos neurotransmisores (por ejemplo, la presencia del transportador vesicular de glutamato, VGlut2) (Schneeberger y cols., 2018).

Dada la diversidad de regiones dentro del SNC que son MCH-receptivas y que presentan inervación MCHérgica, se han descrito para dicho neuropéptido numerosas funciones entre las que se encuentran la regulación de la ingesta de alimento, del ciclo sueño-vigilia, del control del estado de ánimo y la consolidación de la memoria, entre otras (Adamantidis y cols., 2005; Lagos y cols., 2011a; Rossi y cols., 1997; Urbanavicius y cols., 2014).

En relación a la participación de la MCH en procesos de memoria, estudios previos han descrito al hipocampo como una de las estructuras que recibe una gran densidad de aferencias MCHérgicas y que presenta una alta expresión del receptor MCHR-1 (Diniz y cols., 2019; Niño-Rivero y cols., 2019; Ruiz-Viroga y cols., 2023). Datos publicados por nuestro grupo de investigación indican que, luego de la microinyección intracerebroventricular (i.c.v.) de un conjugado de MCH con la molécula fluorescente rodamina (R-MCH), se logró determinar que neuronas presentes en distintas regiones de la formación hipocampal (por ejemplo, CA1, CA2 y el giro dentado) son receptivas para la MCH debido a que captaron de forma específica y receptor-dependiente dicho conjugado (Ruiz-Viroga y cols., 2021). Se puso en evidencia que dicha captación de R-MCH era bloqueada parcialmente al co-administrar un antagonista de los MCHR-1 y también con un bloqueante de la internalización dependiente de clatrina. Esta serie de experimentos aportó evidencia no solo acerca del sistema de internalización de la MCH, sino también sobre la dependencia del MCHR-1 para llevar a cabo el proceso de internalización (Ruiz-Viroga y cols., 2021). Por otra parte, nuestro grupo de trabajo también logró evidenciar la presencia de los receptores MCHR-1 en las cilias primarias de las neuronas del hipocampo de rata (Niño-Rivero y cols., 2019). Junto con el hipocampo, otras estructuras del sistema límbico que participan en la formación de memorias, como el núcleo accumbens (NAc) y el núcleo septolateral (NSL) demostraron ser MCH-receptivas y sus neuronas captaron a la R-MCH (Bittencourt y cols., 1992). Estas evidencias apuntan a que la presencia de fibras MCHérgicas en estas estructuras y la presencia de neuronas receptivas a la MCH haría a dicho

neuropéptido partícipe de los procesos modulados por el hipocampo dorsal y otras estructuras conectadas con éste.

Las evidencias anatómicas descritas anteriormente en complemento con evidencias funcionales fueron capaces de fundamentar el rol de la MCH en la formación y consolidación de la memoria descrito en estudios previos. Por ejemplo, Monzon y cols. (1999) lograron demostrar que la microinyección bilateral de MCH intra-hipocampal fue capaz de aumentar la latencia en el test de evitación inhibitoria, mostrando una retención de la memoria más eficaz que en los controles. Varas y cols. (2002) demostraron que la MCH administrada de forma similar a Monzon y cols. (1999) no solo aumentó la latencia de *step down* en el test de esquiva inhibitoria, sino que también aumentó la expresión de las subunidades NR1 y NR2B de los receptores NMDA en el hipocampo. Mediante el análisis de rodajas de hipocampo (específicamente giro dentado), los autores propusieron que la MCH produjo un aumento de la eficacia sináptica para generar LTP, mediante un mecanismo dependiente de NMDA. Este mecanismo subyacería a las mejoras cognitivas producto de una facilitación de inducción de LTP, acarreado por un aumento de la expresión de subunidades clave de los NMDAR en el giro dentado (Varas y cols., 2002, 2003). Este fenómeno descrito en estos trabajos podría explicar, en parte, los efectos potenciadores de la MCH sobre la memoria desde un punto de vista de la neurotransmisión glutamatérgica. Los autores discuten la hipótesis de que el aumento de la expresión de dichas subunidades del receptor NMDA facilitarían la generación de LTP en el hipocampo, haciendo más eficiente el proceso de consolidación de la memoria y mejorando la capacidad de aprendizaje de los animales. Otros estudios reportaron una neurotransmisión glutamatérgica deficiente en rodajas de hipocampo provenientes de ratones *knock-out* para el receptor MCHR-1 (Adamantidis y cols., 2005; Pachoud y cols., 2010). En el estudio de Pachoud y cols. (2010) se describe que, utilizando ratones *knock-out* para el receptor MCHR-1, la ausencia de éste en rodajas de hipocampo tuvo como consecuencia una alteración para la generación de LTD, que los autores vincularon a las perturbaciones generadas en los receptores NMDA.

Otros estudios también han centrado su atención sobre los efectos de la MCH en otras estructuras que participan en la modulación de la memoria. Estudios *in vivo* realizados por Monzon y cols. (1999) demostraron que la inyección de MCH en hipocampo, amígdala y la corteza entorrinal presenta efectos distintos de acuerdo a la estructura donde se administró la MCH. Utilizando el ensayo de esquiva inhibitoria, se observó que la administración de MCH

en el hipocampo ejerció efectos inmediatamente de realizado el ensayo comportamental y a las 4 horas post-inyección. Esto indicaría que la MCH es capaz de inducir efectos duraderos reflejados en un aumento de la latencia de *step-down* (Monzon y cols., 1999). Distintos patrones se observaron a nivel de la corteza entorrinal y la amígdala. Mientras que la administración de MCH en la corteza entorrinal no tuvo efectos sobre la latencia de *step-down* ni a inmediatamente luego de la sesión de entrenamiento ni a las 4 horas post-inyección, dicho tratamiento, pero aplicado en la amígdala ejerció su efecto solo inmediatamente luego de la sesión de entrenamiento pero no 4 horas después (Monzon y cols., 1999). Las observaciones de este estudio reafirmaron la idea de que la amígdala participa en el almacenamiento de memorias con carga emocional con la ayuda de sistemas hormonales vinculados al estrés, mientras que aquellas memorias sin carga emocional son almacenadas en el hipocampo a partir de la experiencia y sin colaboración de otras estructuras (Cahill and McGaugh, 1998). Abounoori y cols. (2022) discuten sobre la importancia de la amígdala en el almacenamiento de memoria y aprendizaje asociados a la obtención de recompensas e identifican como mediadores químicos de tal proceso a neurotransmisores como GABA y las orexinas, entre otros (Abounoori y cols., 2022). Otras estructuras como el hipocampo ventral, presentan estrecha conectividad con estructuras diferentes a las que conecta el hipocampo dorsal, siendo algunas de ellas la corteza prefrontal y el eje hipotálamo-hipofisario-adrenal, sugiriendo el rol del hipocampo ventral en la asociación de memorias a la emocionalidad (Barkus y cols., 2010). Numerosos estudios han asociado lesiones a estructuras del hipocampo ventral con la desaparición de conductas como el congelamiento frente a estímulos aversivos. Uno de ellos fue llevado a cabo por Richmond y cols. (1999), quienes estudiaron los efectos de lesiones aplicadas al hipocampo ventral, dorsal o ambos en ensayos de condicionamiento del miedo (Richmond y cols., 1999). Los resultados obtenidos demostraron que el comportamiento de congelamiento solo se vio afectado cuando la lesión fue aplicada en el hipocampo ventral, manteniendo la memoria espacial intacta. Los autores concluyeron que el hipocampo cumple múltiples funciones en cuanto a la adquisición de memoria espacial y congelamiento contextual (Barkus y cols., 2010).

En contrapartida a estos trabajos en que se describen efectos potenciadores de la memoria ante la administración de MCH, otros estudios describen un rol de poda de parte de la MCH (Grosmark y cols., 2012; Izawa y cols., 2019; Li y cols., 2017). Izawa y cols. (2019) evidenciaron que luego de la activación por optogenética de dichas neuronas, cuando al

exponer ratones a la prueba de reconocimiento de objeto novedoso (NORT; del inglés, *Novel Object Recognition Test*) exhibieron una pobre discriminación entre el objeto familiar y novedoso. En ratones donde las neuronas MCHérgicas fueron inactivadas, estos presentaron una mayor retención de la memoria tanto en el NORT como en la prueba de miedo condicionado, habiendo presentado tiempos de *freezing* superiores al grupo control (Izawa y cols., 2019). Habiéndose descrito previamente que estas neuronas MCHérgicas se encuentran activas durante el sueño REM, los autores sugieren que estas mismas neuronas son las que afectan la memoria durante este estado comportamental (Izawa y cols., 2019). Así, Li y cols. (2017) describieron que neuronas activas durante el sueño REM interfieren en procesos de formación de memoria permitiendo la formación de conexiones más estables y la eliminación de otras priorizando aquellas que resultan importantes para la mejora de habilidades motoras (Li y cols., 2017). Por otro lado, estudios recientes de activación de neuronas MCHérgicas por optogenética, evidenciaron que dicha activación facilita la plasticidad sináptica *in vitro* disminuyendo el umbral requerido para fenómenos de LTP (Harris and Burdakov, 2024). Los autores sugieren que dicho fenómeno se debe a la participación de la combinación de múltiples neurotransmisores como el glutamato, GABA y MCH (Beekly y cols., 2023).

En conjunto, tanto los estudios que evidencian un rol pro-cognitivo de la MCH, así como otros que proponen un rol activo en la eliminación de memorias, ponen de manifiesto el rol modulador de la MCH sobre los procesos de memoria y en los mecanismos subyacentes. Sumado a esto, cabe destacar que los resultados contradictorios podrían ser producto de diferencias en el diseño experimental, vías y etapa de administración de moduladores y pruebas comportamentales empleadas en cada estudio. Tanto es así que, a pesar de estas evidencias descritas, resta profundizar en la dependencia de la aplicación de la MCH a estructuras anatómicas específicas vinculadas a la memoria y sus efectos sobre su formación. Por ejemplo, son pocos los estudios que tratan sobre la administración de MCH sobre los procesos de formación de memorias episódicas. Este abordaje experimental podría fortalecer y consolidar la hipótesis que postula a la MCH como un neuropéptido favorecedor en la formación de la memoria.

1.4. Memoria y Enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una patología neurodegenerativa y progresiva que consiste en un deterioro continuo de la memoria y otras funciones cognitivas, representando una de las formas más comunes de demencia. Existen dos tipos descritos de EA: de comienzo temprano (forma familiar) o de comienzo tardío (forma esporádica)(Chibnik y cols., 2017; Prince y cols., 2016). La primera presenta un patrón de herencia autosómico dominante mientras que la segunda posee factores predisponentes tanto genéticos como ambientales y es mayoritaria, con más del 90 % de los casos. A nivel morfológico y celular, se ha determinado que los cerebros *post-mortem* de pacientes con EA se caracterizan por la presencia de depósitos del péptido β -amiloide ($A\beta$, del inglés *amyloid beta*) y de ovillos neurofibrilares como consecuencia de la hiperfosforilación de la proteína Tau (τ), acompañado de alteraciones en múltiples sistemas de neurotransmisión, siendo la neurotransmisión glutamatérgica hipocampal una de las más estudiadas (Kaar y cols., 2024; Liu y cols., 2023). Además, hoy en día se conoce que otros muchos procesos patológicos convergen en la EA, aunque no son exclusivos de la misma, como la neuroinflamación, la disfunción mitocondrial, la disbiosis, entre muchos otros (Adami y cols., 2017; Silva y cols., 2022).

Estudios recientes llevados a cabo por Calafate y cols. (2023) han demostrado que el sistema MCHérgico es uno de los sistemas que se ve afectado por la EA inducida en modelos transgénicos de ratones (Calafate y cols., 2023). En el modelo murino de *App*^{NL-G-F}, lograron evidenciar una disminución en la latencia del sueño REM asociada a una disminución de neuronas MCHérgicas activas en el hipocampo (Calafate y cols., 2023). Además, fue posible evidenciar anomalías morfológicas en fibras MCHérgicas aferentes al hipocampo, demostrando que dichas fibras posiblemente estén presentando dificultades para liberar MCH en dicha estructura, afectando la modulación de la actividad neuronal en el hipocampo (Calafate y cols., 2023). Otros estudios han sugerido a la MCH como un agente neuroprotector para contrarrestar algunos de los procesos patológicos que colaboran con el avance de la EA. Habiendo demostrado que la MCH es capaz de favorecer la retención de memoria y habiéndose evidenciado previamente que es capaz de ejercer efectos neuroprotectores en un modelo de Enfermedad de Parkinson, tras la activación de la cascada de señalización MAPK/ERK, Oh y cols. (2019) demostraron la capacidad de la MCH de reducir la concentración de β -amiloide soluble en el hipocampo de ratas pre-tratadas con β -amiloide por vía i.c.v. (Oh

y cols., 2019). Los efectos beneficiosos de la MCH no solo se observaron a nivel comportamental a través del ensayo de esquivas pasiva inhibitoria sino también en el laberinto acuático de Morris, demostrando una mejora en la retención de memorias. También se observó un efecto de la MCH en la facilitación para generar LTP en CA1 en rodajas de hipocampo. En base a estos resultados y los reportados por Park y cols. (2017), los autores sugieren a la MCH como un potencial agente terapéutico capaz de atenuar los déficits cognitivos característicos de la EA (Oh y cols., 2019; Park y cols., 2017).

1.5. Estreptozotocina intracerebroventricular: un modelo esporádico de EA

Existen numerosos estudios que asocian la EA esporádica con alteraciones sobre la señalización de la insulina en el cerebro. Debido a esta observación se ha descrito que cuando se manifiesta la EA, el cerebro se vuelve resistente a la insulina, por lo que a dicha patología se la ha nombrado en numerosas ocasiones como Diabetes tipo III (Grünblatt y cols., 2007; Salkovic-Petrisic y cols., 2009). A raíz de estas observaciones, Hoyer y cols. (2009) propusieron un modelo capaz de emular los efectos de la EA, utilizando a la estreptozotocina administrada en dosis subdiabetogénicas por vía i.c.v. para inducir el estado de resistencia a la insulina por parte del cerebro (Hoyer y cols., 1994).

La STZ es una glucosamina que al ser aplicada por vía sistémica presenta efectos citotóxicos para las células β pancreáticas, induciendo diabetes de tipo I al internalizarse en las células a través de los transportadores de glucosa, llevando posteriormente a su muerte celular (Grieb, 2016; Salkovic-Petrisic y cols., 2013). Al administrarse STZ por vía intracerebral, en dosis subdiabetogénicas, se describió que induce una “diabetes de tipo III” dado que afecta la homeostasis de la insulina y glucosa en el cerebro, influyendo sobre la expresión de receptores y transportadores para ambas (Lannert & Hoyer, 1998). Asimismo, la administración de STZ por vía i.c.v. genera neurodegeneración de las neuronas del hipocampo (entre otras áreas), afecta la neurotransmisión colinérgica y recapitula características morfológicas descritas en cerebros de pacientes con EA en estudios post-mortem (Kamat y cols., 2016; Saper & German, 1987). A nivel tisular se observó acumulación del péptido $A\beta$ y de la proteína τ hiperfosforilada a los tres meses de haber realizado la microinyección de STZ (Knezovic y cols., 2015; Salkovic-Petrisic y cols., 2013). Por otro lado, Santos y cols. (2012) reportaron alteraciones de la memoria de trabajo espacial en el laberinto acuático de Morris que se evidenciaron tan sólo tres horas luego de la administración i.c.v. de STZ. Estas

alteraciones mnémicas se acompañaron de un aumento de la expresión de GFAP y de Fluoro-Jade C, indicando la presencia de astrogliosis y neurodegeneración (Oliveira Santos y cols., 2012).

Este modelo ha demostrado ser efectivo para la emulación y estudio de los procesos patológicos característicos de la EA tanto a nivel morfológico como comportamental (Ravelli y cols., 2017; Salkovic-Petrisic y cols., 2009). Ravelli y cols. (2017) lograron evidenciar un déficit cognitivo reflejado en una disminución de la discriminación durante el ensayo de reconocimiento de objeto novedoso (NORT) a partir de las tres semanas post-inyección de STZ a una dosis final de 3 mg/kg. Dicho patrón fue descrito previamente por Knezovic y cols. (2015) quienes describieron un deterioro en el desempeño en el test de esquiña inhibitoria de los animales un mes luego de la administración de STZ i.c.v. acompañado de un deterioro morfológico referido a un aumento de placas de β -amiloide y proteína tau hiperfosforilada en el hipocampo (Knezovic y cols., 2015).

A pesar de que las evidencias expuestas anteriormente sugieren que la MCH juega un rol importante en los procesos de aprendizaje y memoria, no se ha estudiado si el sistema MCHérgico podría estar alterado en alguno de los modelos animales de EA esporádica o si la administración crónica intracerebral de MCH podría atenuar los déficits cognitivos evidenciados en dichos modelos. En esta tesis se evaluarán los efectos de la MCH sobre la memoria episódica al ser administrada en estructuras relacionadas como el hipocampo dorsal y si su administración crónica es capaz de reducir los déficits a nivel comportamental observados en el modelo de administración i.c.v. de STZ.

2. HIPÓTESIS

De todas las evidencias planteadas anteriormente es posible concluir que la actividad de neuronas MCHérgicas es capaz de modular la actividad neuronal a nivel del hipocampo dorsal influyendo sobre la formación de memoria de tipo episódica. Tales procesos dependen directa e indirectamente de la MCH liberada a nivel hipocampal. Respecto a condiciones patológicas como en la EA, se sabe que la MCH se ve afectada en cuanto a su actividad e inervación del hipocampo debido a anomalías morfológicas presentes en las aferencias MCHérgicas. En base a las evidencias descritas, proponemos como **hipótesis de trabajo** que:

1) La administración aguda intra-hipocampal de MCH en ratas será capaz de inducir efectos pro-cognitivos en los procesos de memoria episódica.

2) El tratamiento crónico con MCH será capaz de atenuar los déficits de memoria descritas para el modelo de EA por microinyección de STZ.

3. OBJETIVO GENERAL

- 1) Estudiar los efectos de la administración aguda de MCH sobre los procesos de memoria desde un punto de vista comportamental y molecular.
- 2) Evaluar, en el modelo de EA inducido por STZ, la capacidad de la MCH administrada de forma crónica de atenuar las alteraciones comportamentales observadas.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) *Evaluar los efectos de la administración intra-hipocampal aguda de MCH a distintas dosis sobre la memoria empleando las pruebas comportamentales NORT y LCEm.*
- 2) *Evaluar si el efecto de la MCH es dependiente de los receptores MCHR-1 pre-tratando a las ratas con un antagonista de dicho receptor.*
- 3) *Evaluar por western-blot y PCR cambios en la expresión de distintos marcadores moleculares como MCHR-1 TrkB, BDNF, NR1, NR2A y NR2B en la modulación de la memoria a nivel hipocampal en animales tratados con MCH aguda.*

- 4) *Evaluar los efectos de la administración intracerebroventricular crónica de MCH sobre las alteraciones cognitivas en el modelo de EA inducido por STZ empleando el ensayo de NORT.*

5. METODOLOGÍA

5.1. Drogas, insumos y reactivos utilizados

La MCH (Phoenix Pharmaceuticals Inc., Belmont, CA, Estados Unidos; H-070-47) se diluyó en una solución de NaCl 0,9% para obtener una cantidad final de 25, 50, 200 y 500 ng. El antagonista de MCHR-1, N-[cis-4-[[4-(dimethylamino)-2-quinazoliny]amino]cyclohexyl]-3,4-difluorobenzamide hydrochloride, ATC-0175 (Tocris Bioscience, Bristol, Reino Unido) se diluyó en una solución de Tween 80% en agua destilada para obtener una concentración de 1 mM. La STZ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, Estados Unidos) fue diluida en líquido cefalorraquídeo artificial (LCRa: CaCl₂ 1.15 mM; NaCl 120mM; KCl 3 mM; MgCl 0.8 mM; NaH₂PO₄ 0.33 mM; NH₂CO₃ 27mM) a una dosis de 1,5 mg/Kg.

5.2. Animales

Se utilizaron ratas macho adultas de la cepa Wistar de 280 – 300 gr de 2 meses aproximadamente criados en la Unidad de Reactivos y Biomodelos de Experimentación (URBE) de la Facultad de Medicina de la Universidad de la República (Uruguay). Los animales fueron criados y alojados en grupos de 3-4 ratas por jaula con comida y agua *ad libitum*, y mantenidos en condiciones de temperatura y luz controladas (22 ± 2°C; 12/12 horas de ciclo luz-oscuridad). Todos los procedimientos fueron aprobados por la Comisión Ética en el Uso de Animales (CEUA; Nº de expediente: 070153-000011-17).

5.3. Pruebas comportamentales

La secuencia de pruebas comportamentales se inició 3 días luego del implante de cánulas. Todos los procedimientos se realizaron durante la primera mitad de la fase del ciclo diurno en una sala con niveles de iluminación controlados por luxómetro digital (Dr. Meter, modelo LX1330B) (ver esquema más adelante). Cada animal fue evaluado en cada día aproximadamente a la misma hora con el fin de controlar la conocida influencia del ritmo circadiano sobre el comportamiento. El orden en el cual los animales de los diferentes grupos experimentales se evaluaron fue contrabalanceado. Al finalizar cada ensayo para cada animal, los aparatos empleados se higienizaron con EtOH al 70 % para prevenir la posible influencia de claves olfativas. Todos los ensayos fueron filmados y dichos videos posteriormente analizados.

5.3.1. Prueba de reconocimiento de Objeto Novedoso

La prueba o ensayo de reconocimiento novedoso (NORT; del inglés, *Novel Object Recognition Task*) ha sido muy empleado para estudiar la memoria a corto, mediano y largo plazo sin la necesidad de sesiones repetidas de entrenamiento ni de recompensas o motivaciones exógenas para el animal (Antunes & Biala, 2012). Esto es debido a que se apoya en la preferencia intrínseca de los roedores por los estímulos novedosos frente a un estímulo familiar (Bevins & Besheer, 2006; Ennaceur, 2010). Los resultados estarán condicionados por el intervalo entre el ensayo de muestra (presentación de los objetos) y el ensayo de retención (presentación de objeto novedoso). El comportamiento evaluado en este ensayo depende de estructuras como el hipocampo dorsal y la corteza entorrinal, estructuras clave en los procesos de reconocimiento y almacenamiento de memoria episódica (Antunes & Biala, 2012). Para la presente tesis, el ensayo se realizó de acuerdo como fue previamente descrito con modificaciones mínimas (Blanco y cols., 2015; Galeano y cols., 2015; Holubiec y cols., 2018).

5.3.1.1. Aparato

La prueba NORT fue realizada en un Campo Abierto (CA) constituido por una caja de madera laminada negra (80 x 80 cm) con paredes perimetrales de 40 cm de altura. La superficie de la caja se dividió en 25 cuadrantes de igual tamaño delimitados por finas líneas blancas.

5.3.1.2. Procedimiento

En el día 1 y 2 de prueba, se realizaron sesiones de **handling** de 5-7 minutos por rata para reducir el estrés de la manipulación y habituarlas a ésta y al experimentador. La primera sesión se realizó en el bioterio, mientras que la segunda se llevó a cabo en el cuarto de comportamiento donde tuvo lugar el resto de la prueba.

En los días 3 y 4 de la prueba, se realizó la etapa de **habitación al CA**. La finalidad de esta etapa fue evaluar la actividad exploratoria de la rata y disminuir el efecto ansiogénico del espacio en el cual posteriormente tendría lugar la prueba comportamental. Para esta etapa, los luxes se midieron en las cuatro esquinas del CA y en el centro. Los luxes en cada esquina del CA se muestran en el siguiente esquema. Los valores de luxes en cada esquina del CA se

mantuvieron iguales para todos los ensayos. No se observó sesgo generado por las diferencias de iluminación del CA.

12,3	10,4
16,5	
6,0	3,7

Estas sesiones de habituación de 10 minutos cada una fueron registradas con una cámara posicionada sobre el CA y los videos obtenidos se utilizaron para cuantificar el número de cruces realizados por la rata como un índice de la actividad motora del animal. Entre ratas, el aparato fue higienizado con EtOH 70° para eliminar posibles sesgos olfatorios.

En el día 5 y 6 de la prueba, se realizaron los ensayos de **muestra y retención**, respectivamente. La secuencia aplicada en esta etapa se presenta en la Fig. 3. El ensayo de muestra se separó del ensayo de retención por un intervalo inter-ensayo, el cual varió su duración de acuerdo al grupo experimental empleado. En el ensayo de muestra se colocaron dos objetos idénticos entre sí en dos esquinas del CA. Estos objetos utilizados en el ensayo de muestra se les denominó objetos familiares. Al iniciar el ensayo, la rata fue colocada mirando hacia la pared opuesta a la que se encontraban los objetos. Durante el ensayo de muestra se permitió por 5 minutos la exploración de los objetos por parte de la rata, entendiéndose exploración cuando la rata posicionaba su hocico a una distancia inferior o menor de 2 cm de los objetos. Contactos como pararse sobre los objetos o tocarlos con la cola no fueron considerados como exploración. Al finalizar el ensayo de muestra, las ratas fueron removidas del CA y colocadas en una jaula individual donde se realizó la administración de MCH, su vehículo o la co-administración de MCH y el antagonista ATC-0175 (Fig. 3A). Al finalizar, fueron devueltas a su jaula. El tiempo transcurrido entre el ensayo de muestra y retención varió de acuerdo a los objetivos de cada experimento. Durante el ensayo de retención, los animales fueron colocados en el CA con uno de los objetos presentados en el EM (objeto familiar) y un objeto con el que nunca interactuaron (objeto novedoso). Durante los 5 minutos del ensayo de retención, se permitió que los animales exploren los objetos presentados, manteniendo los mismos criterios utilizados durante el EM.

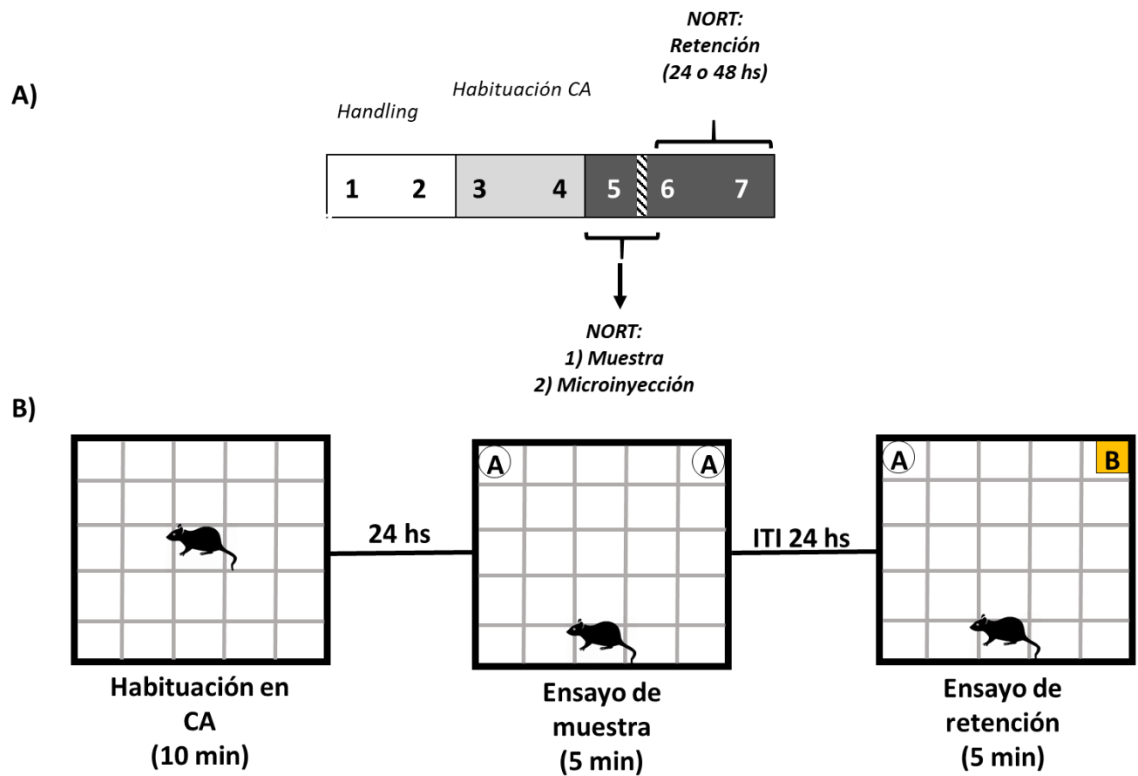


Fig. 3. Secuencia experimental para la prueba NORT. A, secuencia completa para la prueba NORT. **B,** esquema representativo de las etapas de habituación al CA, ensayo de muestra y ensayo de retención de la prueba NORT.

El tiempo de exploración durante el EM y ER se registró a los 3 y 5 minutos. Uno de los motivos se debe a que la actividad exploratoria de los roedores en el NORT varía con el tiempo, normalmente siendo más frecuente al principio debido a la novedad de los objetos presentes, lo cual decae con el tiempo debido a una habituación de parte del roedor a los objetos y al espacio (Antunes & Biala, 2012; Ennaceur, 2010). Durante el ensayo de retención se calcularon dos parámetros: índice de discriminación ($d1$) y la relación de discriminación ($d2$) que se calcularon con las siguientes fórmulas:

$$d1 = tn - tf$$

$$d2 = \frac{tn - tf}{tn + tf}$$

siendo t_n el tiempo que las ratas exploraron el objeto novedoso y t_f el tiempo que las ratas exploran el objeto familiar. Los videos registrados se cuantificaron de forma manual por parte del experimentador de manera no ciega.

5.3.2. Laberinto en Cruz Elevado modificado

La prueba del Laberinto en Cruz Elevado modificado (LCEm) es utilizada para analizar la capacidad de retención de memoria espacial de los roedores (Itoh y cols., 1991; Kruk-Słomka y cols., 2012; López y cols., 2017). En esta prueba se cuantifica el tiempo (latencia de transferencia, LT) en que los roedores demoran en desplazarse desde el extremo de uno de los brazos abiertos (situación aversiva) a la intersección con los brazos cerrados (situación menos aversiva). Se realiza exponiendo a los animales al LCEm durante tres ensayos (denominados LT1, LT2 y LT3) separados por intervalos de 24 horas entre sí. Se espera que los animales del grupo control durante LT1 demoren más tiempo, y que, una vez aprendido el recorrido con ayuda de claves distales, demoren progresivamente menos tiempo en llegar a los brazos cerrados en LT2 y LT3.

5.3.2.1. Aparato

El LCEm es una estructura de madera que consiste de dos brazos abiertos (50 x 11 cm) y dos brazos cerrados (50 x 11 x 40 cm) dispuestos de forma tal que los brazos abiertos y cerrados sean opuestos a sí mismos. El laberinto se elevó a 50 cm de altura del suelo.

5.3.2.2. Procedimiento

Las ratas fueron alojadas en el cuarto de comportamiento 24 horas antes de iniciar la prueba. Para evitar sesgos olfatorios, el laberinto fue higienizado con EtOH 70% entre cada rata durante todas las etapas del LCEm. En el día 1, cada rata se colocó durante 5 minutos en el CA previamente descrito para la prueba NORT. Esta etapa tuvo como objetivo evaluar la actividad locomotora como reflejo de la ansiedad experimental para detectar falsos positivos o negativos posibles durante la prueba. Luego, cada rata se colocó en uno de los extremos de alguno de los brazos abiertos. Una vez que la rata entró a uno de los dos brazos cerrados, se dejó que explore 10 segundos y posteriormente fue devuelta a su jaula. Aquellas ratas que demoraron más de 90 segundos en llegar a los brazos cerrados, fueron excluidas de futuros ensayos. El tiempo en alcanzar los brazos cerrados (latencia de transferencia) se midió en el día 1 (LT1, sesión de adquisición), día 2 (LT2, sesión de retención) y día 3 (LT3, sesión de efectos

duraderos). Inmediatamente luego del LT1, las ratas fueron removidas del laberinto para recibir una microinyección intra-hipocampal bilateral de MCH, su vehículo o la co-administración de MCH y el antagonista ATC-0175. En los dos días siguientes, se midió la latencia de transferencia (LT2 y LT3), culminando el ensayo una vez que las ratas se encontraron con las 4 patas dentro de alguno de los brazos cerrados.

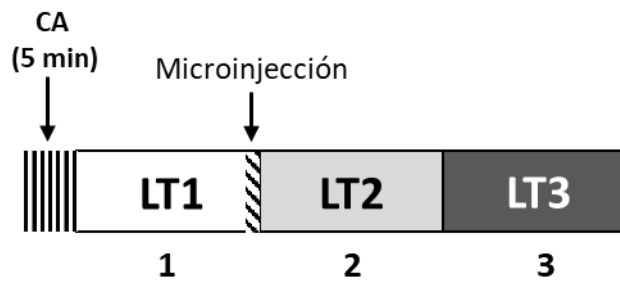


Fig. 4. Secuencia experimental para la prueba LCEm. Cada etapa de la prueba se realizó 24 horas luego de la anterior. En el día 1, inmediatamente luego de pasar por el LCEm, se realizó la microinyección bilateral intra-hipocampal a cada rata y se devolvió a su jaula.

5.4. Puesta a punto de las pruebas comportamentales

A continuación, se describen los grupos experimentales que se consideraron para el desarrollo de la presente tesis de doctorado.

5.4.1. Puesta a punto de la prueba NORT

- Intervalo inter-ensayo (ITI) de 1 h (n = 9)
- Intervalo inter-ensayo (ITI) de 4 hs (n = 10)
- Intervalo inter-ensayo (ITI) de 24 hs (n = 10)
- Intervalo inter-ensayo (ITI) de 48 hs (n = 12)

Durante la puesta a punto del NORT en nuestro laboratorio se evaluaron varios grupos experimentales variando la duración del ITI entre el EM y el ER. En base a la literatura previa, y a nuestros propios resultados, se testearon ITIs de 1, 4, 24 y 48 horas con el objetivo de evaluar cuál de todos los intervalos de tiempo era el adecuado para evidenciar los efectos de los tratamientos aplicados a las ratas. Para cada uno de los ITI se repitió la secuencia experimental con grupos independientes de ratas.

Los grupos utilizados para la puesta a punto del NORT no fueron sometidos a ningún procedimiento quirúrgico ya que no se les aplicó ningún tratamiento farmacológico. El objetivo de su realización era detectar el patrón de comportamiento de los animales bajo las distintas condiciones de dicha prueba comportamental.

5.4.2. Puesta a punto de la prueba LCEm

Para realizar esta prueba, se colocaron a los animales en el laberinto y se cronometró la latencia de transferencia de las ratas (n = 10) en cada día de ensayo, para asegurar que las condiciones de la prueba eran adecuadas para combinar con los correspondientes tratamientos farmacológicos. Al igual que para la puesta a punto del NORT, los animales del grupo de puesta a punto del LCEm no fueron sometidos a ningún procedimiento quirúrgico previamente.

5.5. Objetivo específico 1: Efectos de la administración aguda intra-hipocampal de MCH

Para evaluar los efectos del tratamiento agudo intra-hipocampal de MCH se aplicaron los siguientes grupos experimentales:

- MCH intra-hipocampal agudo (200 ng) (n = 12); Veh (n = 7).
- MCH intra-hipocampal agudo (500 ng) (n = 11); Veh (n = 8).
- MCH intra-hipocampal agudo (50 ng) (n = 9); Veh (n = 8).
- MCH intra-hipocampal agudo (25 ng) (n = 10); Veh (n = 10).

5.5.1. Cirugía estereotáxica

Las ratas fueron implantadas con cánulas intra-hipocampales bilaterales en la región correspondiente a CA1 (coordinadas en base a bregma: AP: -3,6 mm; L: \pm 2,8 mm, DV: -3,1; atlas de Paxinos & Watson, 2005). Para esto, los animales fueron anestesiados por vía intraperitoneal (i.p.) con una mezcla de ketamina (90 mg/kg) y xilacina (5 mg/kg) y posteriormente colocados en el aparato estereotáxico. Una vez fijados los animales, se procedió a realizar una incisión sobre la línea media del cráneo para exponer la calota craneana. Luego se realizaron dos agujeros en el cráneo para colocar las cánulas guía intra-

hipocampales (21G, 15 mm de longitud) que fueron fijadas con acrílico dental y tres tornillos de acero inoxidable como anclas para el implante en la calota craneana. Tres días luego de la cirugía se iniciaron las pruebas comportamentales descritas previamente. Durante estos días, los animales volvieron a alojarse en el bioterio y se los trató con antibióticos subcutáneos para evitar infecciones alrededor del implante.

5.5.2. Microinyección intra-hipocampal de MCH

Tres días después de realizada la cirugía se procedió a realizar la prueba NORT y posteriormente la prueba LCEm. La secuencia experimental se detalla en el siguiente esquema (Fig. 5)

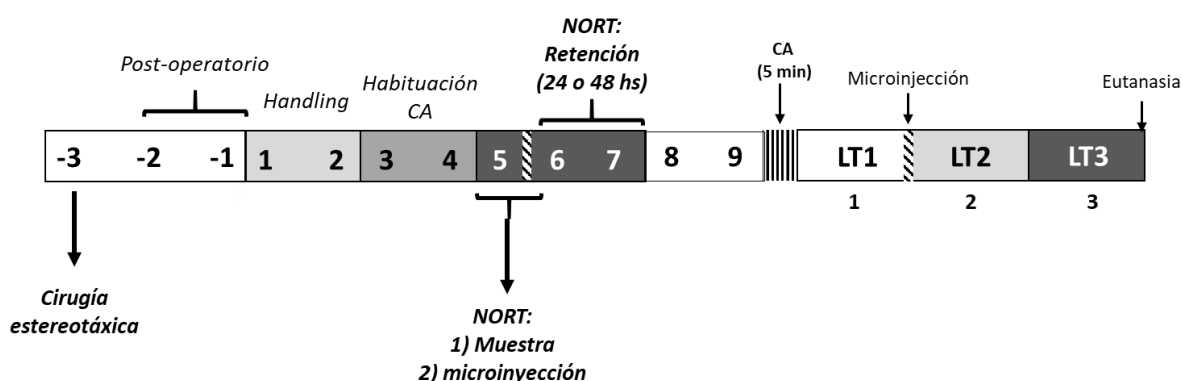


Fig. 5. Secuencia experimental para grupos de tratamiento agudo. Tres días luego de la cirugía estereotáxica se realizaron dos días de handling (5 minutos por sesión). Luego se realizaron dos días de habituación al CA (10 minutos por rata). En el día 5 se realizó el ensayo de muestra (5 minutos) y posterior microinyección. Luego de 24 o 48 horas, se llevó a cabo el ensayo de retención (5 minutos). Tres días después de finalizado el NORT, se dio inicio al ensayo de LCEm, el cual se repartió en 3 días. En el día 1 se puso a cada rata 5 minutos en el CA y luego en el LCEm (LT1). Separado por 24 horas, se realizó el LT2 y al día siguiente el LT3. Al finalizar el LT3, los animales fueron sacrificados.

Las condiciones para la prueba de NORT se emplearon como se describe en el ítem 5.3.1.2. Los ITIs seleccionados para estos experimentos fueron 24 y 48 horas. Luego del ensayo de muestra, se colocó una cánula de administración en la cánula guía para inyectar la MCH 0,2 µL

de forma bilateral a un flujo de 0,1 $\mu\text{L}/\text{min}$. Los controles recibieron vehículo (NaCl 0,9%) inyectado bajo las mismas condiciones. Luego de finalizada la inyección, la cánula de administración se dejó 30 segundos para permitir la difusión del volumen inyectado.

Durante la prueba del LCEm, la inyección de MCH o vehículo fue realizada bajo las mismas condiciones inmediatamente luego de finalizada la sesión de LT1.

5.5.3. Localización de cánula guía

Luego de finalizados los ensayos comportamentales, las ratas fueron anestesiadas con uretano (1,2 mg/Kg, i.p.) y perfundidas por vía transcardíaca con 250 mL de NaCl 0,9% y 400 mL de solución fijadora (paraformaldehído, PFA 4%) bajo campana utilizando una bomba de perfusión a un flujo de 25 mL/min. Los cerebros fueron disecados y fijados por inmersión en una solución de PFA 4% durante 24 horas. Posteriormente, fueron inmersos en una solución de crioprotección (sacarosa 30% en PBS 0,2M) durante 48 horas. Luego de dicho tiempo, los cerebros fueron incluidos en bloques en el montante CryO-Z-T (Ted Pella, Inc) y congelados en hielo seco y mantenidos a -80°C hasta ser cortados. Se obtuvieron cortes coronales (30 μm de espesor) en un crióstato (Leica, Alemania) a -22°C . Los cortes obtenidos fueron teñidos con violeta de cresilo (0,05%) para verificar la correcta implantación de las cánulas guía. Aquellas ratas con cánulas fuera de las coordenadas indicadas en el ítem 5.5.1. fueron descartadas para posteriores análisis.

5.6. Objetivo específico 2: Administración intra-hipocampal aguda de ATC-0175 y MCH

Para demostrar que los efectos producidos por la MCH a nivel hipocampal eran dependientes de su receptor MCHR-1, se realizaron grupos experimentales a los que se les administró MCH o su vehículo, o se co-administró el antagonista del MCHR-1, ATC-0175, de manera previa a MCH (200 ng). Los grupos experimentales se distribuyeron de la siguiente forma:

- Veh (NaCl 0,9%; n = 10)
- MCH (200 ng; n = 10)
- ATC + MCH 200 ng (n = 10)

Las condiciones del ensayo NORT y de inyección de MCH (200 ng) y ATC-0175 (1 mM) para estos grupos experimentales se describieron en el ítem 5.5.2. y solo se utilizó un ITI de 24 horas. En el caso de los grupos pre-tratados con ATC-0175, primero se inyectó de forma bilateral un volumen de 0,2 μ L a un flujo de 0,1 μ L/min. Luego de la inyección del antagonista, se procedió a inyectar la MCH en las mismas condiciones que el ATC-0175.

Posterior a la prueba NORT, a estos grupos se les extrajo el cerebro para llevar a cabo estudios moleculares sobre las muestras extraídas para estudiar los efectos de dichos tratamientos sobre la expresión de genes y proteínas vinculados en la formación de memorias, como BDNF, TrkB, MCHR-1 y subunidades específicas de los NMDARs como la NR1, NR2A y NR2B.

5.7. Objetivo específico 3: PCR y western-blot

Al finalizar la prueba NORT, las ratas de los grupos experimentales tratados en forma aguda con MCH, su vehículo o co-administrados con el antagonista de MCHR-1 y MCH, fueron eutanasiadas y los cerebros disecados en frío para enlentecer su degradación. A continuación, fueron pesados y almacenados a -80°C hasta su envío al Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA, Málaga, España), donde se realizaron los ensayos bioquímicos descritos a continuación. En dicho laboratorio de cada cerebro se disecaron hipocampo izquierdo y derecho a partir de cortes de 2 mm de espesor.

Las PCR en tiempo real se realizaron utilizando primers específicos de TaqMan® Gene Expression Assays (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA; Tabla 1). Los hipocampos disecados se homogenizaron en hielo y se extrajo el ARN siguiendo el método Trizol® recomendado por ThermoFisher Scientific y cuantificado usando un espectrofotómetro para asegurar una relación A260/280 de 1.8–2.0. Luego de realizar la reacción de transcriptasa reversa a partir de 1 µg de ARNm, se llevó a cabo una qPCR (del inglés, *quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction*) usando el sistema de detección CFX96™ Real-Time PCR (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) y el fluoróforo FAM para *TaqMan® Gene Expression Assays* (ThermoFisher Scientific) fue analizado. La curva de *melting* se analizó para asegurar que la reacción dio solo un producto de amplificación. Los valores obtenidos de las muestras se normalizaron contra el gen de referencia de la β-actina.

Tabla 1. Primers para ensayos de expresión génica Taqman®

Gen	Assay ID	GenBank Accession Number	Largo de amplicón (bp)
Actb	Rn00667869_m1	NM_031144.3	91
Grin1	Rn01436034_m1	NM_008169	157
Grin2a	Rn00561341_m1	NM_008170	180
Grin2b	Rn00680474_m1	NM_008171	249
Mchr1	Rn00755896_m1	NM_031758.1	84
Bdnf	Rn02531967_s1	NM_001270630.1	142
Ntrk2	Rn01441749_m1	NM_001163168.2	73

Para los ensayos de *western blot*, de las muestras de hipocampo se extrajeron proteínas utilizando 500 µL de buffer de lisis conteniendo Triton X-100, 1M ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazineetanesulfónico (HEPES), 0,1M de ácido etilenediaminetetraacético (EDTA), pirofosfato de sodio, fluoruro de sodio (NaF), ortovanadato de sodio (NaOV) e inhibidores de proteasas durante 30 minutos. Se empleó el método de Bradford para determinar la concentración de proteínas en las muestras. Una cantidad de 50 µg de proteína se cargó en un gel Criterion XT Precast de 4–12% (Bis-Tris) (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA, número de catálogo: 3450124), y luego transferido a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA). El contenido proteico total se visualizó tras el marcado con rojo Ponceau. Las membranas de nitrocelulosa se bloquearon con TBS-T (50 mM Tris-HCl (pH 7.6), 200 mM NaCl, y 0.1% Tween 20) con 2% de fracción de albumina V de BSA (Roche, Mannheim, Germany) por 1 hora a temperatura ambiente. Para la detección específica de proteínas, las membranas se incubaron *overnight* a 4°C en TBS-T con BSA y el anticuerpo primario correspondiente (Tabla 2). La γ -adaptina se usó como proteína control (Rivera y cols., 2020). Luego de lavados repetidos en TBS-T con 1% de Tween 20, un anticuerpo secundario anti-rabbit conjugado con peroxidasa de rábano (diluida 1:10.000) se agregó y se incubó por 1 hora a temperatura ambiente. Posterior a lavados en TBS-T, las membranas se incubaron por

1 minuto en el Western Blotting Luminol Reagent kit (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), y las bandas específicas se visualizaron y cuantificaron por quimioluminiscencia usando Chemi-Doc TM MP Imaging System (Bio-Rad, Barcelona, España). La cuantificación de los resultados se realizó usando el software ImageJ. Los resultados se expresaron como la relación entre la proteína objetivo y la γ -adaptina como gen constitutivo. Los niveles de proteínas de los grupos tratados con vehículo se asignaron de forma arbitraria como 1.

Tabla 2. Anticuerpos primarios empleados para detectar la expresión proteica por Western Blot sobre muestras de hipocampo de los grupos pre-tratados con ATC y MCH

Antígeno	Host, Fabricante, código	Dilución
γ -adaptina	Ratón, BD Biosciences (610385)	1/2000
NMDAR1	Conejo, Abcam (ab109182)	1/500
NMDAR2A	Conejo, Sigma Aldrich (07-632)	1/250
NMDAR2B	Conejo, Sigma Aldrich (06-600)	1/250
MCHR-1	Conejo, Thermo Fisher (PA5-50705)	1/250
BDNF	Conejo, Sigma Aldrich (AB1534)	1/250
TrkB	Conejo, Sigma Aldrich (07-225)	1/250

5.8. Objetivo específico 4: administración crónica i.c.v. de MCH o vehículo

Para estudiar los efectos del tratamiento crónico con MCH durante 14 y 30 días sobre la memoria de animales pre-tratados con vehículo o STZ (3 mg/kg) se llevaron a cabo los siguientes grupos experimentales implantados con microbombas osmóticas (MB):

- MB_{Veh} (n = 9)
- MB_{MCH} (n = 9)
- STZ + MB_{Veh} (n = 9)
- STZ + MB_{MCH} (n = 13)

5.8.1. Armado de microbombas y cirugía estereotáxica

El uso de microbombas de infusión han presentado numerosas ventajas que fueron capaces de reducir tanto el tiempo de manipulación al realizar inyecciones crónicas de forma manual así como el estrés a los animales causados por la manipulación del operador (Mangano & Schwarcz, 1983). Estudios de administración crónica de diversos fármacos han demostrado evidenciar que este abordaje representa una estrategia experimental no solo capaz de aportar ventajas desde el punto de vista operacional, sino también que son capaces de generar efectos confiables esperables para cada tratamiento aplicado (Brolin y cols., 2018; Glick y cols., 2009; Gomori y cols., 2003).

5.8.1.1. Armado de microbombas de infusión

Previo al día de la cirugía, se procedió a ensamblar las microbombas osmóticas (ALZET modelo 2002: 200 μ L, 0,5 μ L/hr; Alzet Osmotic Pumps, Cupertino, California, Estados Unidos), de las cuales se liberaron de forma lenta la MCH (a una concentración de 0,71 μ g/ μ L a un flujo de 8 μ g/día) o su vehículo (NaCl 0,9 %) como forma de administración crónica durante 14 días (Della-Zuana y cols., 2002; Gomori y cols., 2003). Primero se armaron los kits de infusión intracerebral, los cuales cuentan con una cánula de 1,3 cm de largo y 0,08 cm de diámetro. A cada kit se le agregaron dos piezas espaciadoras las cuales fueron pegadas con pegamento al kit de infusión. Una vez asegurado que los kits no se encontraban obstruidos por defectos en su fabricación, se conectó cada kit con un tubo de cloruro de polivinilo, de 4 cm de largo. Luego, cada kit (ya unido a su tubo correspondiente) se conectó al extremo distal de dicho

tubo al tubo de llenado, el cual va ubicado dentro de la microbomba osmótica. A continuación, se llenó el tubo de llenado, el tubo conector y el kit de infusión intracerebral con solución salina estéril. Luego de ensamblada la unidad, se registró su peso junto con la microbomba vacía antes de ensamblarla completamente. A continuación, se llenó con la droga o el vehículo correspondiente (200 uL de MCH o NaCl) a una concentración y volumen adecuado para mantener el tratamiento crónico durante el tiempo que permite la microbomba (en este caso 14 días). Una vez llena la microbomba, se volvió a registrar su peso y se colocó en la estufa a 60°C sumergida en solución salina para iniciar el cebado de la microbomba. Al día siguiente se realizó la implantación de la microbomba.

5.8.1.2. Implantación de microbombas

Para los grupos pre-tratados con LCRA o STZ y microbomba, se anestesiaron a las ratas con una mezcla de ketamina (90 mg/kg) y xilacina (5 mg/kg) por vía i.p. Posteriormente las ratas fueron colocadas en el aparato estereotáxico y se realizó una incisión sobre la línea media del cráneo para exponer la calota craneana. Luego, se realizó un agujero a nivel del ventrículo lateral izquierdo (Coordenadas en base a bregma: AP: -0,9; L: $\pm 1,6$; DV: -3,4; atlas de Paxinos & Watson, 2005).

La inyección de STZ o LCRA se realizó en dos días, de los cuales en el segundo día se implantó la microbomba posterior a la segunda inyección de STZ. Para dicha droga, se administró una dosis de 3 mg/Kg en total, utilizando como vehículo líquido cefalorraquídeo artificial (LCRA). Uno de los orificios abiertos para la microinyección fue sellado con cera para hueso (*Bone Wax*, Harvard Apparatus; Holliston, Massachusetts, Estados Unidos), con el objetivo de impedir el sangrado o la pérdida de líquido cefalorraquídeo. Luego de inyectadas las correspondientes drogas, se llevó a cabo la implantación del kit de infusión. El kit de infusión de la microbomba fue fijado al cráneo con acrílico dental y dos tornillos de acero inoxidable a modo de ancla secando previamente la superficie del cráneo para asegurar una correcta adhesión del acrílico a éste. Luego, el corte fue cerrado con hilo de sutura cubriendo el implante y posteriormente higienizado con EtOH 70% y iodofón. La microbomba se colocó debajo de la piel sobre el lomo del animal en un punto inalcanzable para éste, evitando que

pueda removerlo. Los animales fueron tratados con antibióticos por vía subcutánea durante los tres días posteriores a la cirugía.

A partir del día posterior a la cirugía, se inició el conteo de los días de tratamiento, controlando cada dos días el peso de los animales y la ingesta de alimento con el fin de detectar posibles efectos del tratamiento crónico sobre los parámetros mencionados.

Luego de transcurridos los 14 días post implantación, se comenzó la prueba NORT. Para este grupo en particular y esperando ver el efecto del tratamiento crónico con MCH, la secuencia de la prueba NORT fue modificada para adecuarse al objetivo de este bloque experimental. En este caso, se realizó un solo día de *handling*, uno de habituación y el ITI seleccionado fue de 48 horas.

Al día siguiente de finalizada la prueba NORT, se removió la microbomba de las ratas. Para esto, se anestesió a las ratas con una mezcla de ketamina (90 mg/kg) y xilacina (5 mg/kg) por vía i.p. La microbomba se retiró, dejando colocado el kit de infusión en el cráneo de la rata y removiendo con cuidado el tubo y la microbomba. Luego de este paso, la microbomba se pesó y se comparó con el peso antes de implantarla para calcular el volumen liberado durante los 14 días. En los siguientes 15 días, se continuó el monitoreo de la ingesta de alimento y el peso corporal para descartar efectos duraderos del tratamiento crónico con MCH o vehículo. Próximo al día 30 post-implantación, se realizó una segunda prueba NORT con las mismas características que la primera. La secuencia experimental se detalla en el esquema a continuación.

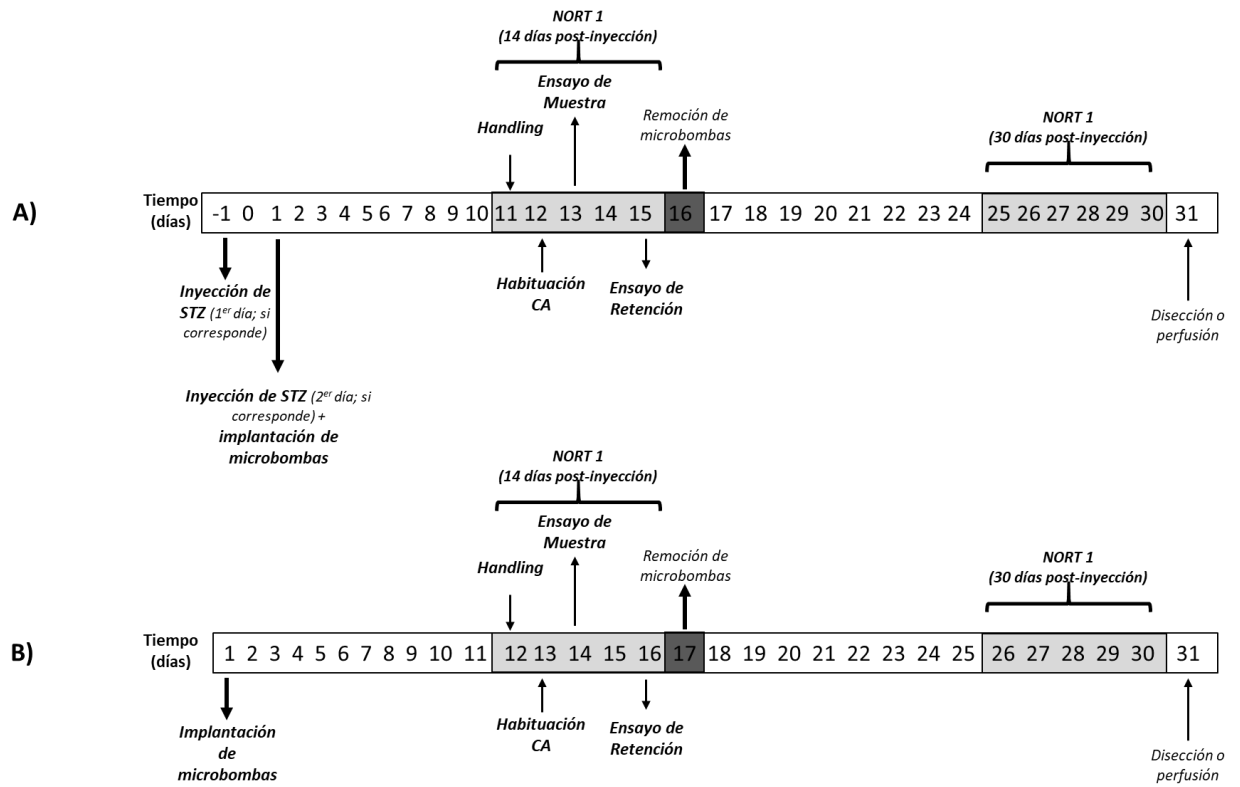


Fig. 6. Secuencia experimental para grupos de administración crónica de MCH. A. Línea temporal para grupos con microbomba y tratados con STZ. **B.** Línea temporal para grupos con microbomba sin tratamiento con STZ.

5.8.1.3. Control de peso corporal e ingesta de alimento

Con el fin de observar el efecto del tratamiento con MCH crónica por vía i.c.v. sobre el peso corporal, éste fue registrado, además de controlar la ingesta de alimento de forma regular hasta el día 30 post-implantación de microbombas. Para el control de la ingesta de alimento, debido a temas de alojamiento del bioterio, cada caja alojó hasta 6 ratas, por lo cual el seguimiento de la ingesta de alimento de cada rata no pudo realizarse de forma individual. Con el objetivo de normalizar los valores de peso corporal de partida de cada grupo experimental, el cambio de peso corporal durante el tratamiento crónico se expresó como la variación de peso respecto al peso de las ratas al iniciar el tratamiento (Della-Zuana et al., 2002).

Para controlar la ingesta de alimento, el día 1 se le ajustaba el peso de la ración a 1000 g por caja de animales. Dos días después, se pesaba la ración restante y se registraba lo que habían consumido en esos dos días. Posteriormente, se le agregaba suficiente comida hasta llegar a los 1000 g. La cantidad consumida se calculó como la diferencia entre el peso de partida de la ración y el remanente. Esta diferencia luego se dividió a la mitad (debido a que correspondía a dos días de consumo) y posteriormente ese valor se dividía entre el número de animales alojados en dicha caja. De esta forma, se obtuvo un estimativo de la ingesta de alimento por parte de cada rata y por día.

5.9. **Análisis estadístico**

Para analizar los efectos del tratamiento agudo (25, 50, 200 o 500 ng) y crónico con MCH en el hipocampo en la prueba NORT, se corrieron pruebas t-test de Student para muestras pareadas. La relación de discriminación (d2) en el ensayo de retención se analizó con el t-test para una muestra. El desempeño de los animales en el LCEm se analizó mediante ANOVA de dos vías, con el factor “día” como el factor intra-sujeto y el factor “tratamiento” (Veh o MCH) como el factor inter-sujeto. Se aplicó el test *post-hoc* de Dunnett's para comparaciones múltiples cuando la interacción día x tratamiento alcanzó significancia estadística. Para analizar los efectos de la administración intra-hipocampal de Vehículo, MCH o MCH + ATC en el ensayo de NORT, se realizó un test ANOVA de dos vías con el “objeto” (novedoso o familiar) como el factor intra-sujeto y el “tratamiento” (Veh, MCH 200 ng o MCH 200 ng + ATC 1mM) como el factor inter-sujeto, seguido del test *post-hoc* de Sidak para comparaciones múltiples. La relación de discriminación (d2) en el ensayo de retención se analizó con la prueba t-test para una muestra. Los resultados de la PCR en tiempo real y Western blot, se analizaron con un test de ANOVA de una vía, seguido del test *post-hoc* de Tukey para comparaciones múltiples. Se calcularon coeficientes de correlación de Pearson entre los niveles de expresión proteica y los valores de d2 obtenidos en el ensayo de retención. Cuando un valor se ubicó debajo o sobre dos desvíos estándar de la media, fue excluido del análisis. Las probabilidades de 5% o inferiores se consideraron como estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$). Todos los resultados fueron analizados y graficados usando el software Graph Prism 7 para Windows (GraphPad software, La Jolla, California, USA).

6. RESULTADOS

A continuación, se presentarán los resultados correspondientes en bloques basados en los distintos grupos experimentales realizados. Los bloques corresponden a:

- Puesta a punto de las pruebas comportamentales (NORT y LCEm)
- Tratamiento agudo con MCH intra-hipocampal: MCH, vehículo y MCH + ATC-0175
- Tratamiento crónico i.c.v. con microbombas osmóticas: MCH y vehículo

6.1. Puesta a punto de las pruebas comportamentales

6.1.1. Puesta a punto de la prueba NORT

Como se mencionó anteriormente, para la puesta a punto de la prueba NORT se utilizaron diversos grupos experimentales variando los ITIs entre EM y ER.

Para los grupos de intervalo inter-ensayo de 1, 4, y 24 horas, el tiempo de exploración del objeto novedoso fue significativamente superior al tiempo para el objeto familiar (Fig. 7). Dichas diferencias significativas fueron apreciables tanto a los 3 como a los 5 minutos de transcurrido el ER. Las diferencias significativas entre los tiempos de exploración para cada objeto disminuyeron mientras mayor era el intervalo inter-ensayo. Este patrón podría indicar que a intervalos inter-ensayos más prolongados, la retención de las ratas podría disminuir. En efecto, cuando transcurrieron 48 horas entre el EM y ER, las ratas exploraron el objeto novedoso y el familiar por tiempos similares careciendo de diferencias significativas entre los tiempos de exploración de cada objeto. Los tiempos de exploración para la puesta a punto se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 3. Tiempos de exploración de los objetos durante el ER para la puesta a punto del NORT. Los tiempos corresponden al tiempo de exploración a los 5 minutos del ER. El tiempo está representado en segundos.

ITI (hrs.)	ON	OF
1	19,61 ± 2,1	7,55 ± 1,7
4	14,85 ± 2,4	6,35 ± 1,3
24	27,6 ± 3,3	16,3 ± 2,8
48	13,3 ± 1,5	11,92 ± 0,96

Al evaluar la capacidad de discriminación de los animales a los 5 minutos del ER al utilizar intervalos de 24 y 48 horas ($0,27 \pm 0,07$ y $0,03 \pm 0,06$, respectivamente) se destacó que, a las 24 horas los animales fueron capaces de discriminar entre el objeto novedoso y el familiar, mientras que, a las 48 horas, los animales no lograron discriminar entre objeto novedoso y familiar, fenómeno que se reflejó en valores de d_2 cercanos a 0 alcanzados los 5 minutos del ER (Fig. 7).

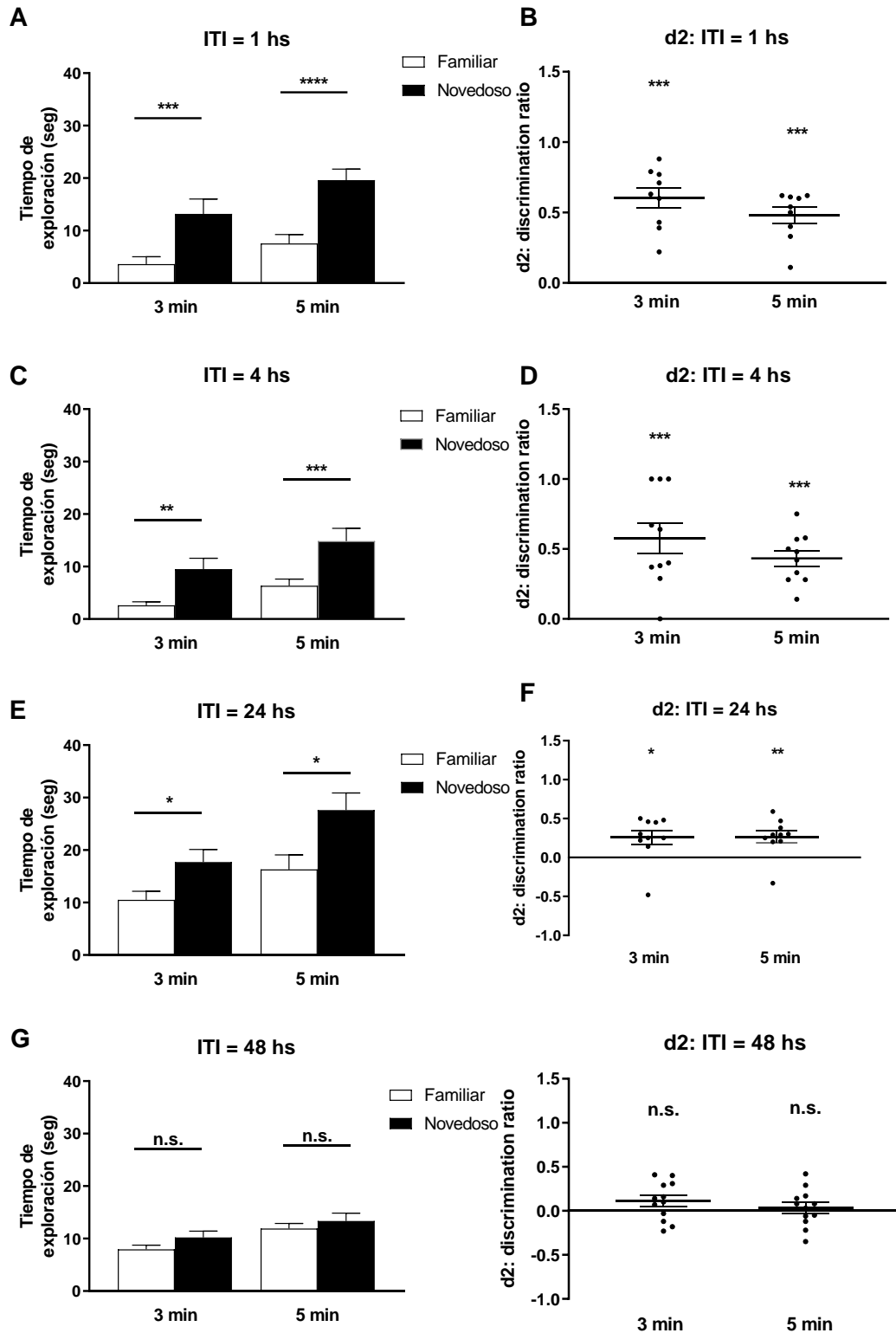


Fig. 7. Desempeño en la prueba de reconocimiento de objeto novedoso en el ER con un ITI de 1, 4, 24 y 48 horas de duración. A, C, E y G, tiempo de exploración del objeto novedoso y familiar con un ITI de 1, 4, 24 y 48 horas a 3 y 5 minutos de transcurrido el ER, respectivamente. Las barras blancas representan el tiempo de exploración del objeto familiar mientras que las negras representan el tiempo de exploración del objeto

novedoso. Se realizaron análisis a los 3 y a los 5 minutos de comenzado el ensayo de retención. Los datos están expresados como la media \pm error estándar de la media. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ (pruebas t para muestras relacionadas). **B, D, F y H**, relación de discriminación con un ITI de 1, 4, 24 y 48 horas a 3 y 5 minutos de transcurrido el ER, respectivamente. Los datos se muestran como gráficos de dispersión mostrando la media \pm error estándar de la media. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs. valor hipotético de 0 (test de t de una muestra). ITI = 1 hora: n = 9 ratas; ITI = 4 horas: n = 10 ratas; ITI = 24 horas: n = 10 ratas; ITI = 48 horas: n = 12 ratas. n.s., no significativo.

De acuerdo a los resultados obtenidos en esta puesta a punto de la prueba NORT, para evaluar los efectos de la administración intra-hipocampal aguda y crónica de MCH en animales controles o tratados con STZ (i.c.v) se decidió aplicar un ITI de 24 y 48 hs, respectivamente. La finalidad de los ITIs seleccionados será medir el potencial pro-cognitivo que podría ejercer el tratamiento agudo con MCH intra-hipocampal.

6.1.2. Puesta a punto de la prueba LCEm

Como se describió en la metodología, en la prueba de LCEm se evaluó en tres días consecutivos la latencia de transferencia de los animales al ser colocados en uno de los brazos abiertos del laberinto. Dicha evaluación se muestra en la siguiente figura:

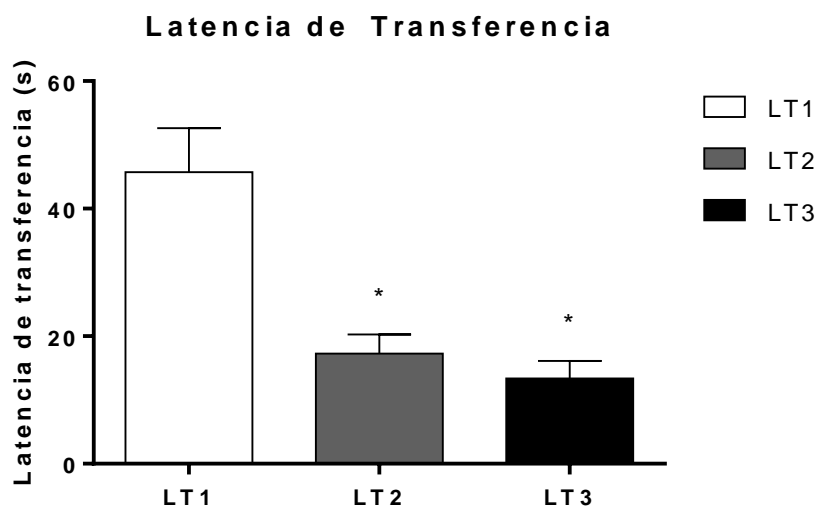


Fig. 8. Latencia de transferencia en animales controles en la prueba LCEm. Los resultados están expresados como la media \pm error estándar. *LT1 vs LT2; *LT1 vs LT3. * $p < 0,0001$. ($F = 14,57$; $p < 0,0001$). No se observaron diferencias significativas entre LT2 y LT3. N = 10.

Los resultados de la puesta a punto de dicha prueba muestran una disminución significativa de la latencia de transferencia en el segundo y tercer día respecto al primero (LT1: $45,74 \pm 6,8$; LT2: $17,25 \pm 3,0$; LT3: $13,37 \pm 2,8$; Fig. 8). Este patrón confirma que las ratas recuerdan la ubicación espacial de los brazos cerrados y el espacio alrededor del LCEm, requiriendo menos tiempo para explorar los alrededores y dirigirse hacia los brazos cerrados. Dicho patrón coincide con el descrito en la bibliografía para grupos experimentales controles lo cual permite la validación del modelo en nuestro laboratorio.

6.2. Efectos del tratamiento agudo con MCH intra-hipocampal

En base a los resultados obtenidos durante la puesta a punto de la prueba NORT, se seleccionaron los ITIs de 24 y 48 horas y una dosis de 200 ng/mL, basados en los trabajos de Lagos y cols. (2009). A las 24 horas luego de la inyección de vehículo, el grupo control exploró significativamente más tiempo el ON que el OF a los 5 minutos del ER ($22,25 \pm 2,4$ segs. y $14,7 \pm 2,2$ segs., respectivamente; Fig. 9A) durante el ensayo de retención. Por lo tanto, presentaron un índice de discriminación significativamente mayor a cero ($0,20 \pm 0,4$; Fig. 9B). Por otro lado, el grupo tratado con 200 ng de MCH exploró durante un tiempo similar el objeto familiar y el novedoso a los 5 minutos del ER ($17,89 \pm 1,2$ segs. y $18,22 \pm 1,5$ segs., respectivamente; Fig. 9A) y, consecuentemente, presentaron una relación de discriminación próxima a cero ($d2: 0,007 \pm 0,05$; Fig. 9B). Los resultados obtenidos demuestran un efecto amnésico del tratamiento con MCH a 200 ng cuando el ITI es de 24 horas. Esto difiere de lo observado para el grupo control y para la validación del modelo en donde los animales control, lograron discriminar entre el ON y el OF 24 horas luego del EM. En los grupos con un ITI de 48 horas se observó el mismo efecto sobre la retención de memoria de la MCH que a las 24 horas. Tanto los controles como los grupos tratados con MCH no fueron capaces de discriminar entre el ON y el OF. El patrón observado para el grupo control se pudo observar previamente en la puesta a punto de la prueba (Fig. 9C). El tiempo de exploración para el ON no presentó diferencias significativas con el tiempo de exploración del OF tanto para los grupos tratados con vehículo como los tratados con MCH (Veh, OF: $16,6 \pm 3,5$ segs, ON: $19,4 \pm 2,2$ segs; MCH, OF: $15,8 \pm 1,9$ segs, ON: $16,73 \pm 1,5$ segs; los tiempos corresponden a los 5 minutos del ER).

Debido a esto, los valores de d_2 tanto para los controles ($0,05 \pm 0,05$) como para los animales tratados con 200 ng de MCH fueron próximos a 0 ($0,06 \pm 0,05$; Fig. 9D).

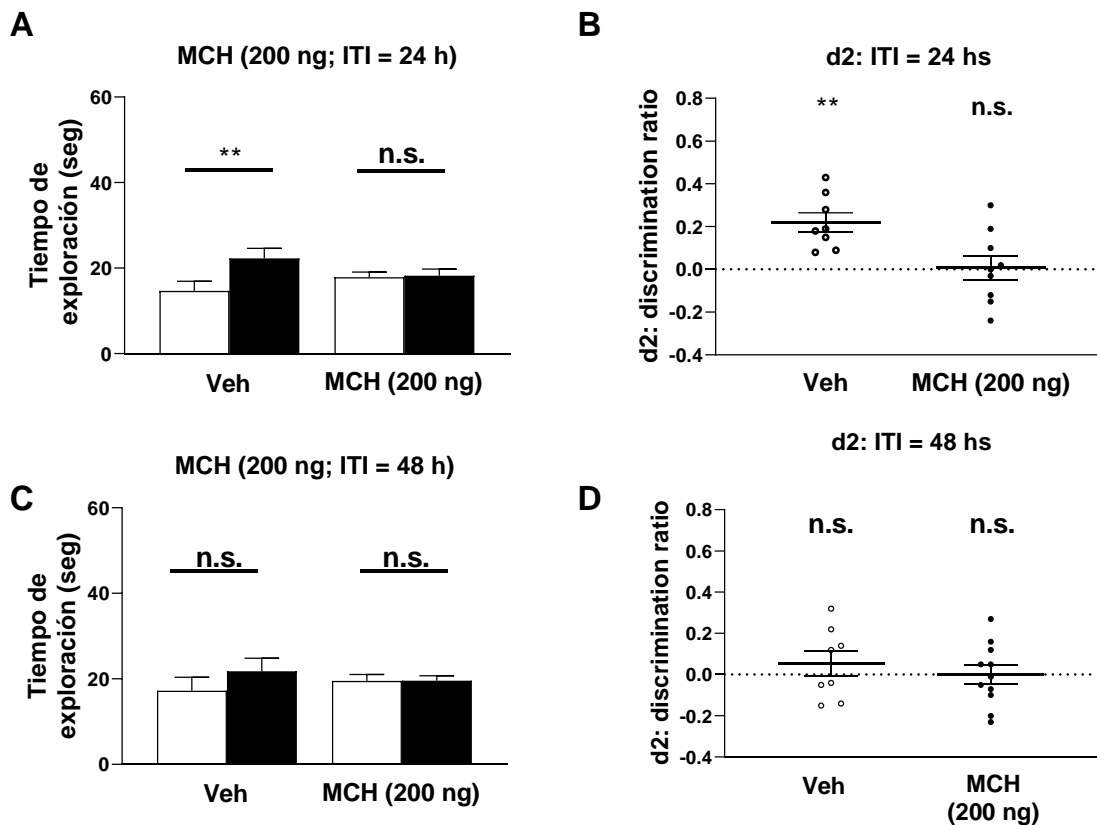


Fig. 9. Prueba de reconocimiento del objeto novedoso en el ensayo de retención, 24 y 48 hs luego de la inyección bilateral intra-hipocampal de vehículo (NaCl) o MCH (200 ng). **A y C:** Tiempo de exploración del objeto familiar y novedoso durante el ensayo de retención 24 y 48 horas, respectivamente. ****** $p < 0,01$; test de t-pareado (dos colas); ITI 24 hrs: Veh: $n = 7$; MCH200: $n = 12$; ITI 48 hs: Veh: $n = 8$; MCH200: $n = 11$. **B y D:** Relación de discriminación. La administración intra-hipocampal de vehículo o MCH se realizó luego de realizado el ensayo de muestra y se analizó 24 y 48 horas después en el ensayo de retención. ****** $p < 0,01$ comparado con un valor medio hipotético de cero (test de t de una muestra a dos colas). n.s., no significativo.

En base a los resultados obtenidos en la serie de experimentos descrita, se observó que el tratamiento con 200 ng de MCH aplicado luego del EM exhibió el efecto amnésico descrito para el mismo tratamiento 24 horas luego de aplicado. A partir de estas observaciones, el ITI seleccionado para evaluar el efecto del tratamiento con MCH a distintas dosis fue de 24 horas.

6.3. Tratamiento agudo con MCH intra-hipocampal

6.3.1. Efectos en el NORT

Para determinar si la administración bilateral de MCH es capaz de ejercer efectos pro-cognitivos o pro-amnésicos se emplearon distintas dosis de MCH con el objetivo de determinar una curva dosis-respuesta. Las cantidades de MCH seleccionadas para los tratamientos agudos (basado en reportes previos) fueron 25, 50, 200 y 500 ng. Los resultados obtenidos para la prueba NORT demostraron que las ratas controles fueron capaces de discriminar entre el objeto novedoso y el familiar, observado en un tiempo de exploración significativamente superior para el objeto novedoso durante los 5 minutos del ensayo de retención (ON: $46 \pm 5,6$ segs; OF: $32,7 \pm 3,5$ segs). Este comportamiento coincidió con el observado para el grupo tratado con 25 ng de MCH (ON: $46,3 \pm 3,1$; OF: $27,3 \pm 2,2$; Fig. 10A). Esta observación es coherente con los resultados obtenidos en el cálculo de d_2 , para el cual tanto el grupo control ($0,16 \pm 0,03$) como el tratado con 25 ng de MCH ($0,26 \pm 0,04$) obtuvieron valores significativamente mayores a 0 (Fig. 10B). Al comparar los valores de d_2 entre el grupo control y el tratado con MCH a 25 ng, se evidenciaron diferencias significativas entre los grupos, presentando posiblemente un efecto pro-cognitivo inducido por el tratamiento aplicado.

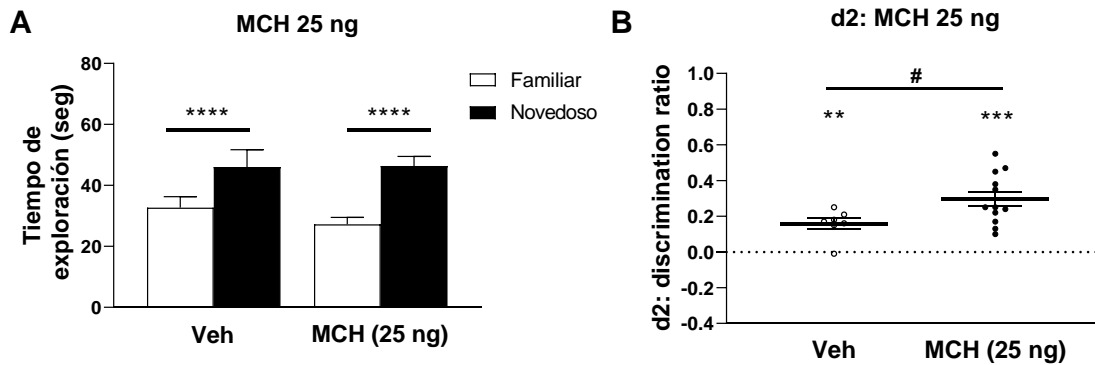


Fig. 10. Prueba de reconocimiento del objeto novedoso en el ensayo de retención, 24 hs luego de la inyección intra-hipocampal de vehículo (NaCl) o MCH (25 ng). **A:** Tiempo de exploración de los objetos familiar y novedoso durante el ensayo de retención para ratas tratadas con vehículo o MCH. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$; test de t-pareado (dos colas). **B:** d2 o relación de discriminación. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ comparado con un valor medio hipotético de cero (test de t de una muestra a dos colas). # $p < 0,05$, test de t no pareado (dos colas). La administración intra-hipocampal de Veh o MCH se realizó luego del ensayo de muestra y se analizó 24 horas después en el ensayo de retención. Veh: $n = 7$; MCH25: $n = 12$.

Al igual que para el grupo anterior, para el grupo tratado control 50 ng de MCH se pudo apreciar un tiempo de exploración superior del objeto novedoso a los 5 minutos del ER (ON: $40,5 \pm 3,6$ segs.; OF: $21,5 \pm 2,7$ segs.; Fig. 11A) tanto al igual que para el grupo con 50 ng de MCH durante el ensayo de retención (ON: $37,3 \pm 4,5$ segs.; OF: $23,5 \pm 3,0$ segs.). De la misma forma, el t-test para una muestra, demostró que ambos grupos (control y MCH50; $0,32 \pm 0,06$ y $0,22 \pm 0,04$, respectivamente) presentaron valores d2 significativamente mayores a 0 (Fig. 11B). Al comparar los valores de d2 para el grupo control y tratado, no observamos diferencias significativas entre estos.

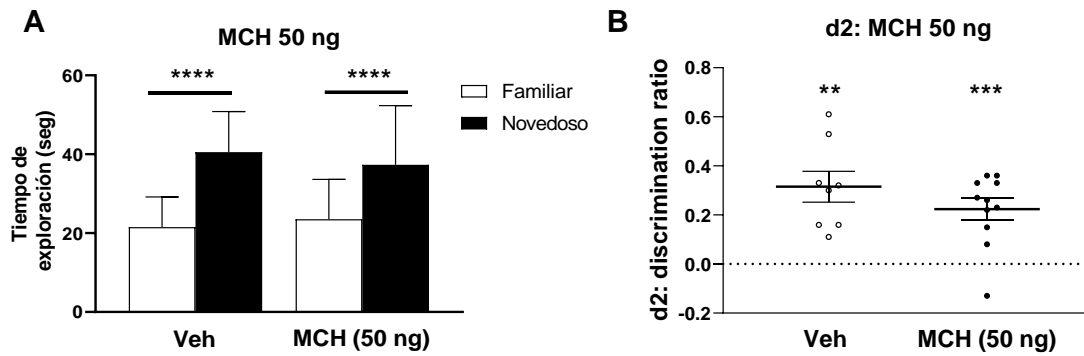


Fig. 11. Prueba de reconocimiento del objeto novedoso en el ensayo de retención, 24 hs luego de la inyección intra-hipocampal vehículo (NaCl) o MCH (50 ng). **A:** Tiempo de exploración de los objetos familiar y novedoso durante el ensayo de retención para ratas tratadas con vehículo o MCH. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$; test de t-pareado (dos colas). **B:** d2 o relación de discriminación. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ comparado con un valor medio hipotético de cero (test de t de una muestra a dos colas). La administración intra-hipocampal de Veh o MCH se realizó luego del ensayo de muestra y se analizó 24 horas después en el ensayo de retención. Veh: $n = 8$; MCH50: $n = 11$.

Al evaluar los resultados obtenidos para el grupo MCH tratado con 200 ng de MCH intra-hipocampal, se observó que el grupo control exhibió un tiempo de exploración significativamente mayor del objeto novedoso en comparación con el objeto familiar a los 5 minutos de transcurrido el ER (ON: $22,3 \pm 2,4$ segs.; OF: $14,7 \pm 2,2$ segs.; con valores de d2 significativamente superiores a 0 ($0,22 \pm 0,04$) (Fig. 9A y B). Sin embargo, al analizar los tiempos de exploración para las ratas tratadas con 200 ng de MCH, no se observaron diferencias significativas entre los tiempos de exploración del objeto novedoso y familiar ($18,22 \pm 1,5$ segs. y $17,89 \pm 1,2$ segs., respectivamente) (Fig. 9A). En consecuencia, los valores de d2 para dicho grupo, no presentaron diferencias significativas a 0 ($0,00 \pm 0,06$) (Fig. 9B).

Al analizar los efectos del tratamiento con 500 ng de MCH, la estadística demostró que el grupo control tuvo una mayor exploración del objeto novedoso (ON: $43,2 \pm 5,5$ segs.; OF: $27,45 \pm 3,5$ segs.) (Fig. 12A) en comparación con el objeto familiar, mientras que en el caso de los animales tratados con 500 ng de MCH esto no fue así (ON: $26,8 \pm 3,4$ segs.; OF: $27,0 \pm 4,1$ segs.) (Fig. 12A). En consecuencia, los valores de d2 para dicho grupo, no presentaron diferencias significativas a 0 (Veh: $0,22 \pm 0,03$; MCH: $0,02 \pm 0,06$) (Fig. 12A y B).

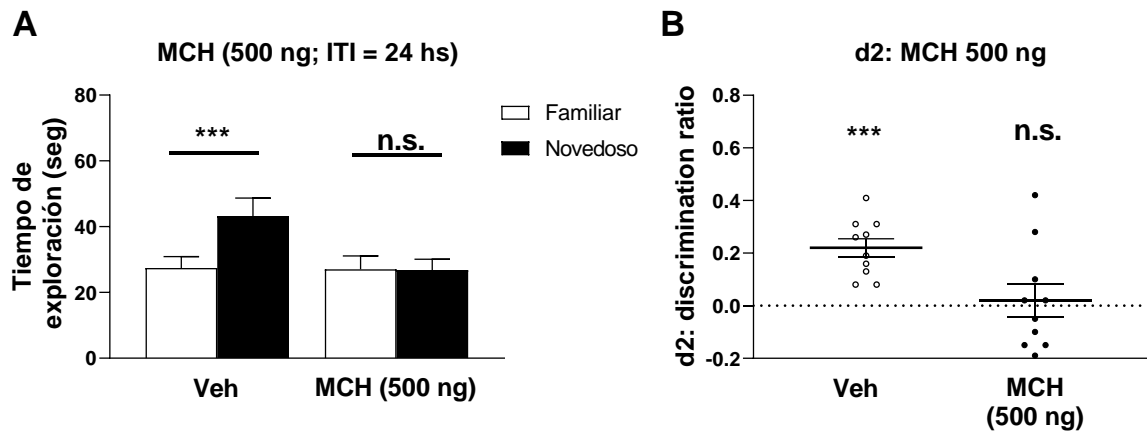


Fig. 12. Prueba de reconocimiento del objeto novedoso en el ensayo de retención, 24 hs luego de la inyección intra-hipocampal de vehículo (NaCl) o MCH (500 ng). **A:** Tiempo de exploración de los objetos familiar y novedoso durante el ensayo de retención para ratas tratadas con vehículo o MCH. *** $p < 0,001$, test de t-pareado (dos colas). **B:** d2 o relación de discriminación. *** $p < 0,001$ comparado con un valor medio hipotético de cero (test de t de una muestra a dos colas). La administración intra-hipocampal de Veh o MCH se realizó luego del ensayo de muestra y se analizó 24 horas después en el ensayo de retención. Veh: $n = 10$; MCH500: $n = 10$.

En resumen, el grupo de resultados descrito anteriormente, demuestra que la administración aguda intra-hipocampal de MCH presenta efectos dosis-dependientes sobre la retención de la memoria. Mientras que el grupo tratado con 50 ng de MCH no presentó diferencias significativas entre el grupo control y el tratado, el grupo que recibió 25 ng de MCH presentó una capacidad de discriminación significativamente mayor a su grupo control, sugiriendo un posible efecto pro-cognitivo sobre la capacidad de discriminación del objeto novedoso y el familiar por parte de las ratas. Por otro lado, las dosis de 200 y 500 ng indujeron efectos pro-amnésicos visibles en los tiempos de exploración similares para el objeto novedoso y familiar y valores de d2 cercanos a 0.

6.3.2. Efectos en el LCEm

La inyección aguda de MCH intra-hipocampal se realizó inmediatamente luego del LT1 utilizando las mismas condiciones de inyección especificadas para la prueba NORT. Se utilizaron los mismos grupos experimentales que para el NORT, dejando 3 días entre ambas pruebas.

Veinticuatro horas posteriores a la administración de 25 ng de MCH o su vehículo, el análisis estadístico demostró que el único factor significativo fue el día. Las ratas presentaron valores para la latencia de transferencia de los brazos abiertos a los cerrados que disminuyeron en cada día del ensayo de LCEm independientemente del tratamiento recibido (Fig. 13A). Este patrón coincide con el esperado para un grupo control sin tratamiento, tal como se observó en la puesta a punto del ensayo (fig.8). Dicho patrón demuestra un desempeño cognitivo apropiado durante las sesiones de retención. Un resultado similar se observó para los grupos que recibieron 50 ng de MCH intra-hipocampal (Fig. 13B).

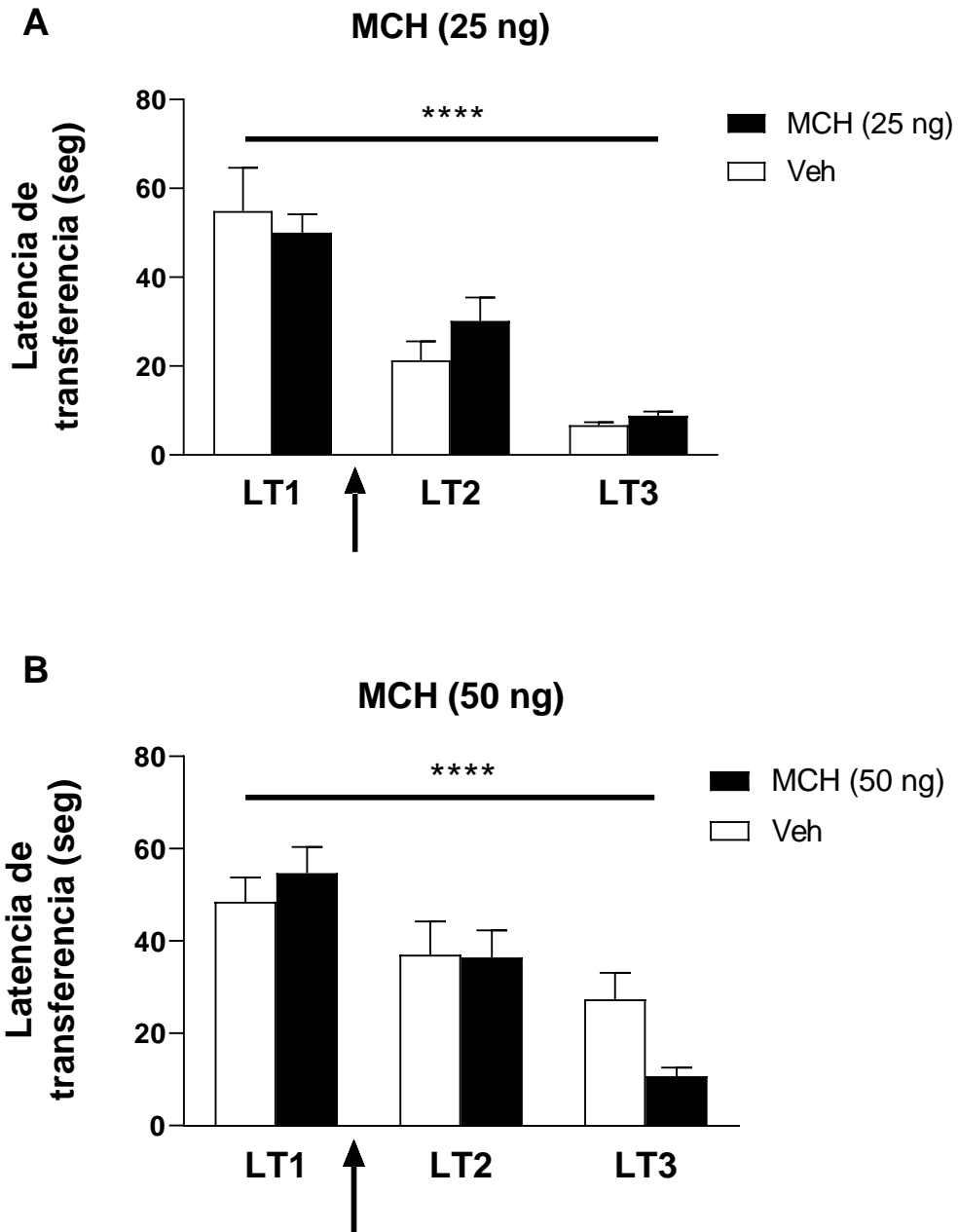


Fig. 13. Prueba LCEm luego de la inyección de MCH o vehículo. **A.** Latencia de transferencia para ratas administradas con vehículo ($n = 7$) o MCH 25 ng ($n=12$). Veh: $F = 36,82$, $p < 0,0001$; MCH 25 ng: $F = 20,87$, $p < 0,0001$ (tests de ANOVA de una vía). **B.** Latencia de transferencia para ratas administradas con vehículo ($n=8$) o MCH 50 ng ($n=11$). Veh: $F = 6,68$; $p < 0,01$; MCH 50 ng: $F = 25,96$, $p < 0,0001$ (tests de ANOVA de una vía). Las barras muestran la media de latencia de transferencia para las tres etapas de la prueba. Los resultados están expresados como la media \pm error estándar. Tukey's post-hoc tests: **** $p < 0,0001$. La flecha indica el momento de inyección de vehículo o MCH.

A diferencia de lo observado para los grupos tratados con 25 y 50 ng de MCH, para aquellas ratas tratadas con 200 ng de MCH una reducción en la latencia de transferencia se pudo observar recién en el tercer día de la prueba a diferencia de los controles para los cuales se observaron reducciones significativas en la latencia de transferencia en el segundo y tercer día en comparación con el primer día de ensayo (Fig. 14A). En ratas tratadas con 500 ng de MCH la disminución en la latencia de transferencia fue significativa al tercer día de la prueba en comparación con el primer día de ensayo (al igual que para el grupo tratado con 200 ng de MCH), mientras que para los controles se observó una significativa disminución de la latencia ya en el día 2 (Fig. 14B).

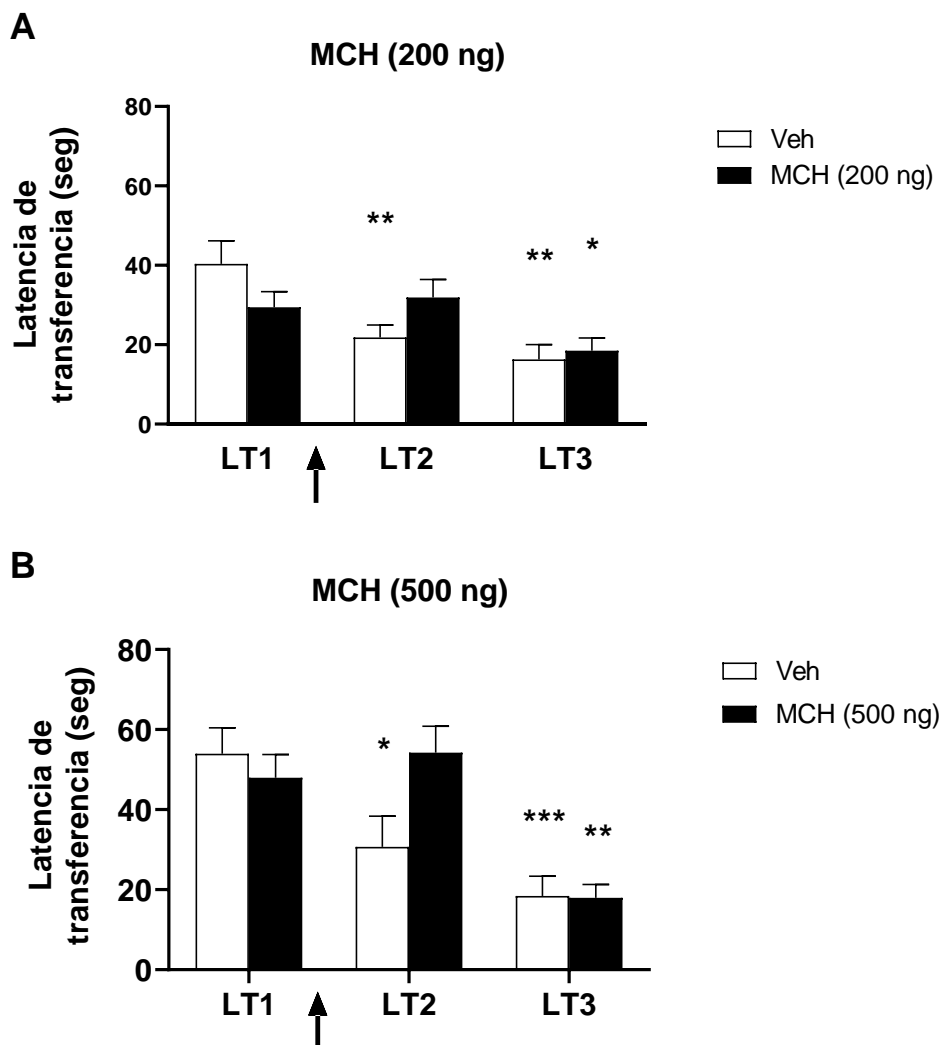


Fig. 14. Prueba LCEm luego de la inyección de MCH a 200 ng o 500 ng o vehículo. (A), Latencia de transferencia luego de inyectar 200 ng de MCH. Las barras muestran la media de latencia de transferencia (segundos) para las tres etapas de la prueba para el grupo control (Veh, NaCl 0,9%; n = 8) o tratado con MCH (200 ng; n = 9) (F = 15,75, p<0,001; F= 4,74, p<0,05, respectivamente; tests de ANOVA de una vía). Los resultados están expresados como la media ± error estándar. No se observaron diferencias significativas entre LT2 y LT3 en el grupo Veh. Tukey's post-hoc tests: *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001. **(B)** Latencia de transferencia luego de inyectar 500 ng de MCH. Las barras muestran la media de latencia de transferencia (segundos) para las tres etapas de la prueba para el grupo control (Veh, NaCl 0,9%; n = 10) o tratado con MCH (500 ng; n = 10) (F = 8,14, p<0,01; F= 11,75, p<0,001, respectivamente; tests de ANOVA de una vía). Los resultados están expresados como la media ± error estándar. No se observaron diferencias significativas entre LT2 y LT3 en el grupo Veh. Tukey's post-hoc tests: *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

Este grupo de resultados demuestra que los grupos tratados con dosis de 25 y 50 ng de MCH no mostraron diferencias respecto a los controles en cuanto a la variación de la latencia de transferencia a lo largo de la prueba. Sin embargo, dosis altas de MCH como 200 y 500 ng exhibieron una fuerte disminución en la latencia de transferencia sólo a partir del día 3 de la prueba. Esto sugiere que dichas dosis de MCH ejercieron un efecto negativo sobre el desempeño comportamental de los animales, posiblemente como producto del efecto pro-amnésico de los tratamientos de 200 y 500 ng. Estos resultados son consistentes con los observados para el ensayo de NORT empleando las mismas cantidades de MCH.

6.3.3. Localización de cánulas

Al finalizar las pruebas comportamentales, los animales fueron sacrificados y el cerebro disecado para verificar la posición de las cánulas, como se describió en la metodología. Aquellos animales que presentaron cánulas mal colocadas o dificultades para realizar la inyección fueron eliminados del análisis. De estos bloques experimentales se descartaron 10 animales por una localización incorrecta de la cánula guía y 5 ratas por presentar infecciones o abscesos en el sitio de inyección.

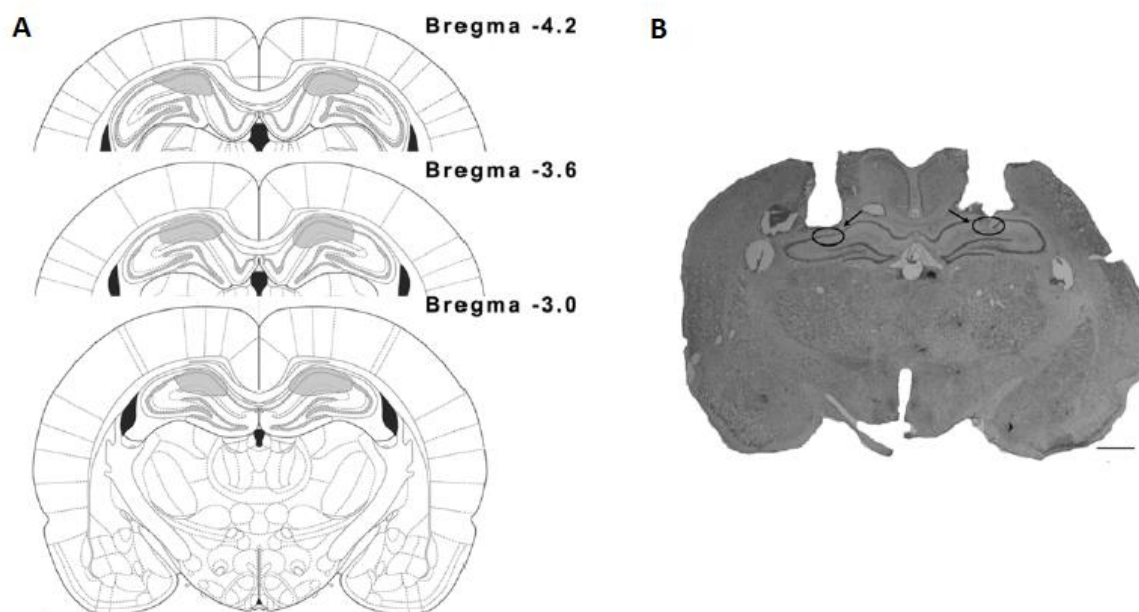


Fig. 15. Representación esquemática de la localización de las cánulas en la región correspondiente a CA1 en el hipocampo de ratas. A. El área sombreada con color gris representa los puntos de localización de las cánulas guía en los grupos correspondientes a los experimentos de administración aguda de MCH en tres planos coronales representativos. Los números representan la distancia de Bregma en mm de acuerdo al atlas Paxinos y Watson. **B.** Microfotografía representativa con tinción de Nissl de un corte coronal mostrando los trazos de ambas cánulas. Las flechas indican los sitios donde se realizó la microinyección intra-hipocampal. Barra de calibración: 1000 μ m.

6.4. Co-administración intra-hipocampal aguda de un antagonista de los MCHR-1 y MCH a 200 ng: efectos sobre la prueba NORT

Con el fin de observar la dependencia de los efectos comportamentales observados en la prueba NORT, tras el tratamiento agudo con MCH, del receptor MCHR-1, se realizaron grupos de co-administración de MCH y un conocido antagonista de los receptores para dicho neuropéptido (el ATC-0175). Para este grupo experimental se eligió el tratamiento con 200 ng ya que fue una de las que demostraron ejercer un efecto pro-amnésico en las pruebas NORT y LCEm.

El análisis demostró que, al administrar vehículo, o ATC + MCH 200 ng, las ratas exploraban durante más tiempo el objeto novedoso que el familiar (Veh, ON: $39,6 \pm 3,0$ segs., OF: $25,0 \pm 2,5$ segs.; ATC+MCH, ON: $38,6 \pm 3,2$ segs.; OF: $24,9 \pm 2,6$ segs.; Fig. 16A). Aquellos animales tratados sólo con 200 ng de MCH exhibieron tiempos de exploración similares para el objeto novedoso y el familiar a los 5 minutos del ER, tal como se describió anteriormente

para el tratamiento agudo de MCH a la misma dosis (ON: $31,5 \pm 3,0$ segs., OF: $32,4 \pm 4,1$ segs.; Fig. 16A). De la misma forma, aquellas ratas tratadas con vehículo o el antagonista ATC + MCH 200 ng, presentaron valores d2 significativamente superiores a 0 (Veh: $0,23 \pm 0,03$; ATC + MCH 200: $0,23 \pm 0,04$; Fig. 16B), demostrando una marcada discriminación del objeto novedoso del familiar. En contrapartida, aquellos animales que recibieron 200 ng de MCH presentaron valores de d2 cercanos a 0 ($0,00 \pm 0,03$) (Fig. 16B), demostrando que no discriminaron entre ambos objetos.

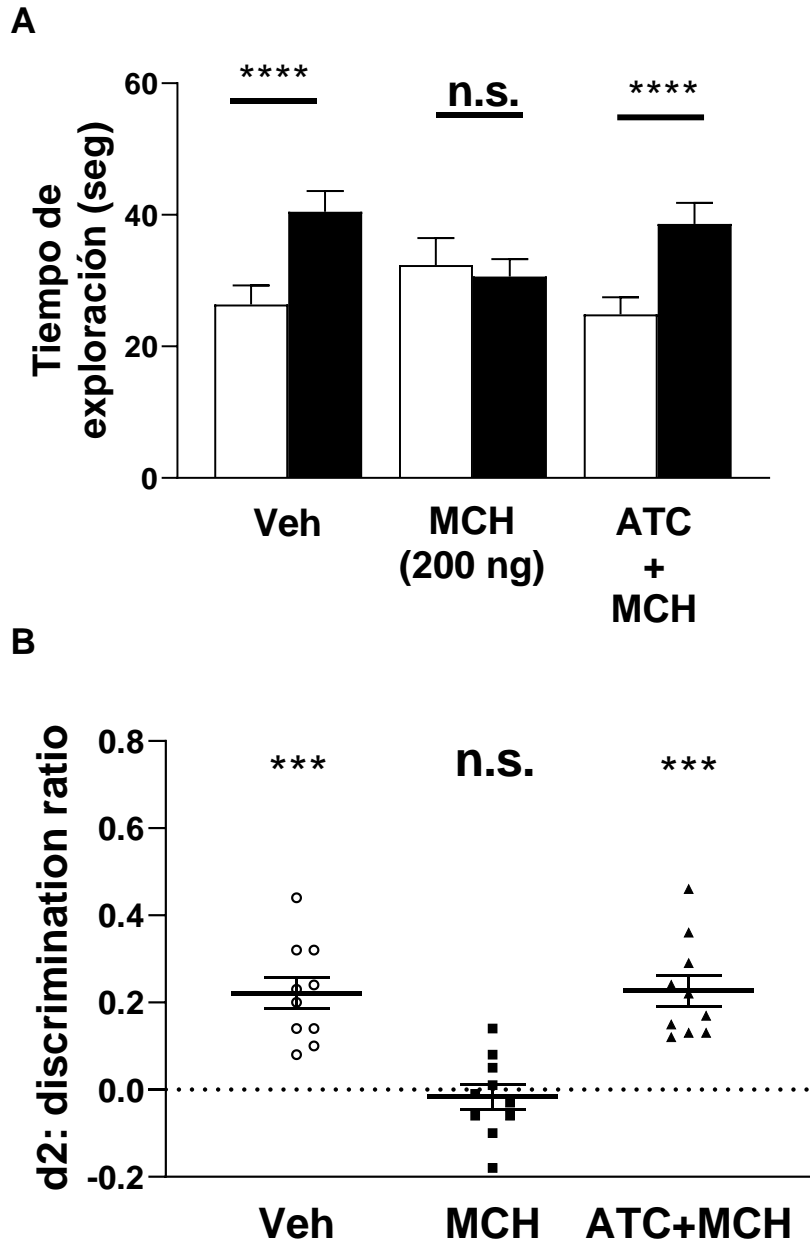


Fig. 16. Prueba de reconocimiento del objeto novedoso en el ensayo de retención, 24 hs luego de la inyección intra-hipocampal de vehículo (NaCl 0,9%), MCH (200 ng) o ATC+MCH (200 ng). **A:** Tiempo de exploración del objeto familiar y novedoso durante el ensayo de retención en animales tratados con Veh (A, n = 10), MCH 200 ng (n = 10) o ATC+MCH (C, n = 10). ****p<0,0001; test de t-pareado (dos colas). **B:** Relación de discriminación ***p<0,001 comparado con un valor medio hipotético de cero (test de t de una muestra con dos colas). La administración intra-hipocampal de Veh, MCH o ATC+MCH se realizó luego de realizado el ensayo de muestra y se analizó 24 horas después en el ensayo de retención. n.s., no significativo.

Los resultados indican que el tratamiento con ATC-0175 fue capaz de antagonizar los efectos pro-amnésicos de la MCH a 200 ng cuando se administran de forma bilateral en el hipocampo 24 horas antes del ensayo de retención. El hecho de que los efectos amnésicos inducidos por el tratamiento con MCH pudo ser bloqueado por el tratamiento con el antagonista del MCHR-1 apunta a que los efectos generados por el tratamiento agudo dependen de la interacción del neuropéptido con su receptor.

6.5. Efectos del tratamiento agudo intra-hipocampal sobre la expresión de marcadores del sistema glutamatérgico, BDNF, TrkB y MCHR-1

Se analizó la expresión de los genes relacionados al sistema glutamatérgico (subunidades Grin1, Grin2a y Grin2b de los receptores NMDA), el codificante para la neurotrofina BDNF y su receptor TrkB, y para el gen del receptor MCHR-1.

En cuanto a los genes codificantes de las subunidades de los receptores de NMDA no se observaron diferencias significativas entre los grupos tratados con MCH y ATC+MCH 200 ng comparado con su control en los niveles de expresión de dichos genes por lo que se procedió a analizar los niveles de presencia de las proteínas codificadas por dichos genes (Fig. 17a, b y c). Para los niveles de expresión génica de *mchr1*, *ntrk2* y *bdnf*, tampoco no se observaron diferencias significativas entre los grupos experimentales (fig. 17d, e y f).

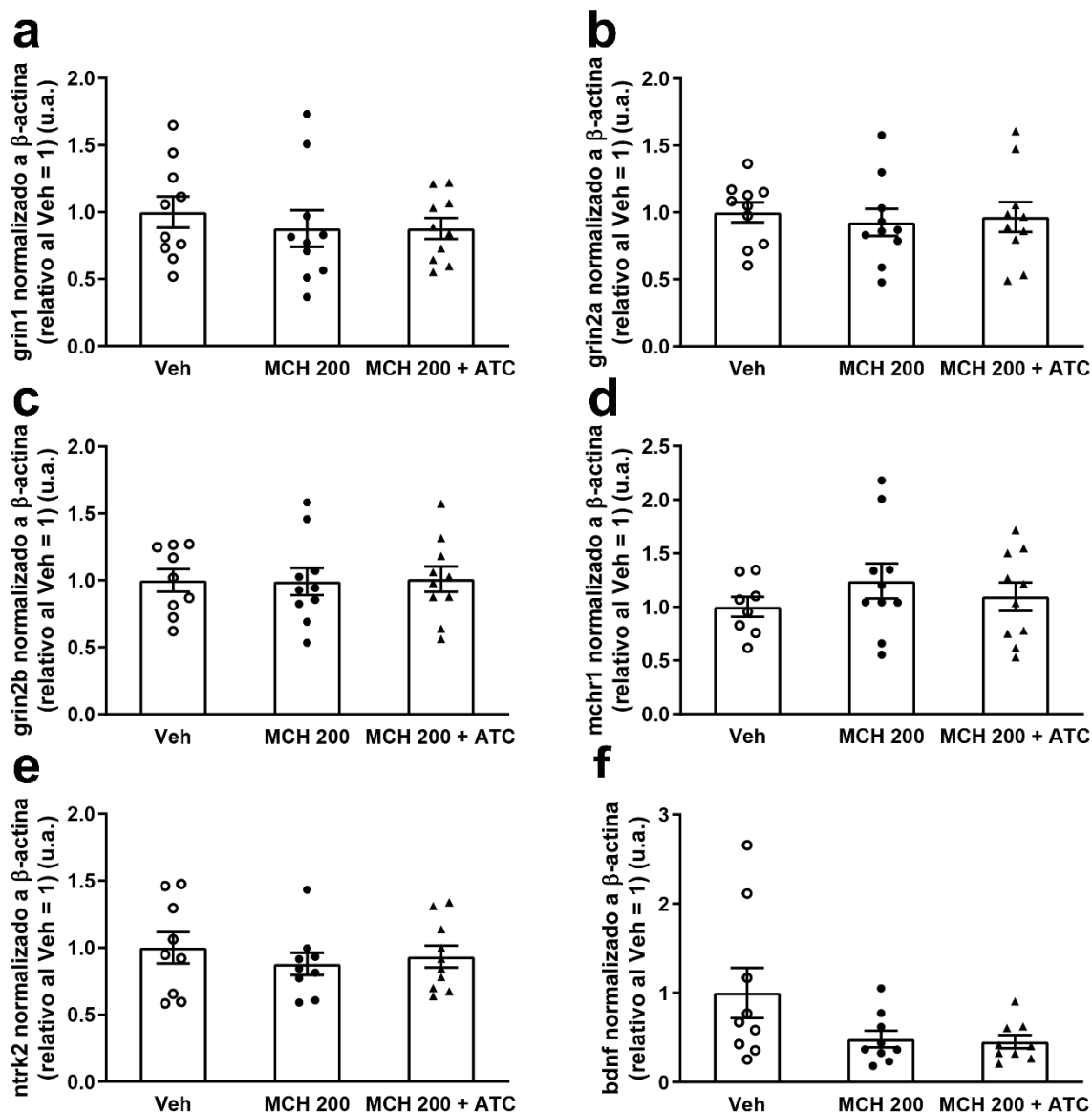


Fig. 17. Efectos de la administración intra-hipocampal de Veh, MCH (200 ng) o ATC + MCH (200 ng) sobre la expresión génica de las subunidades de los receptores NMDA, *bdnf*, *ntrk2* y *mchr-1*. Niveles de expresión hipocampal de (a) *grin1* (Veh, n = 10; MCH 200, n = 10; MCH 200 + ATC, n = 10); (b) *grin2a* (Veh = 10; MCH 200 = 10; ATC + MCH200 = 10); (c) *grin2b* (Veh, n = 9; MCH 200, n = 10; ATC + MCH200, n = 10); (d) *mchr1* (Veh, n = 8; MCH 200, n = 10; ATC + MCH200, n = 10); (e) *ntrk2* (Veh, n = 9; MCH 200, n = 9; ATC + MCH200, n = 10); (f) *bdnf* (Veh, n = 9; MCH 200, n = 9; ATC + MCH200, n = 9). Se eliminaron aquellos valores atípicos (por encima o debajo de 2 desvíos estándar de la media) antes de la normalización al Veh. Luego, se procedió a normalizar todos los valores restantes (incluidos los del propio grupo Veh) a la media del grupo Veh que se estableció arbitrariamente en 1. Los resultados se muestran como puntos de dispersión con la media \pm error estándar de la media superpuesto.

Para el caso de las subunidades de los receptores glutamatérgicos NMDA, no fue posible observar diferencias significativas entre los distintos grupos experimentales en los niveles proteicos hipocampales de NMDAR1, NMDAR2A y NMDAR2B (Fig. 18).

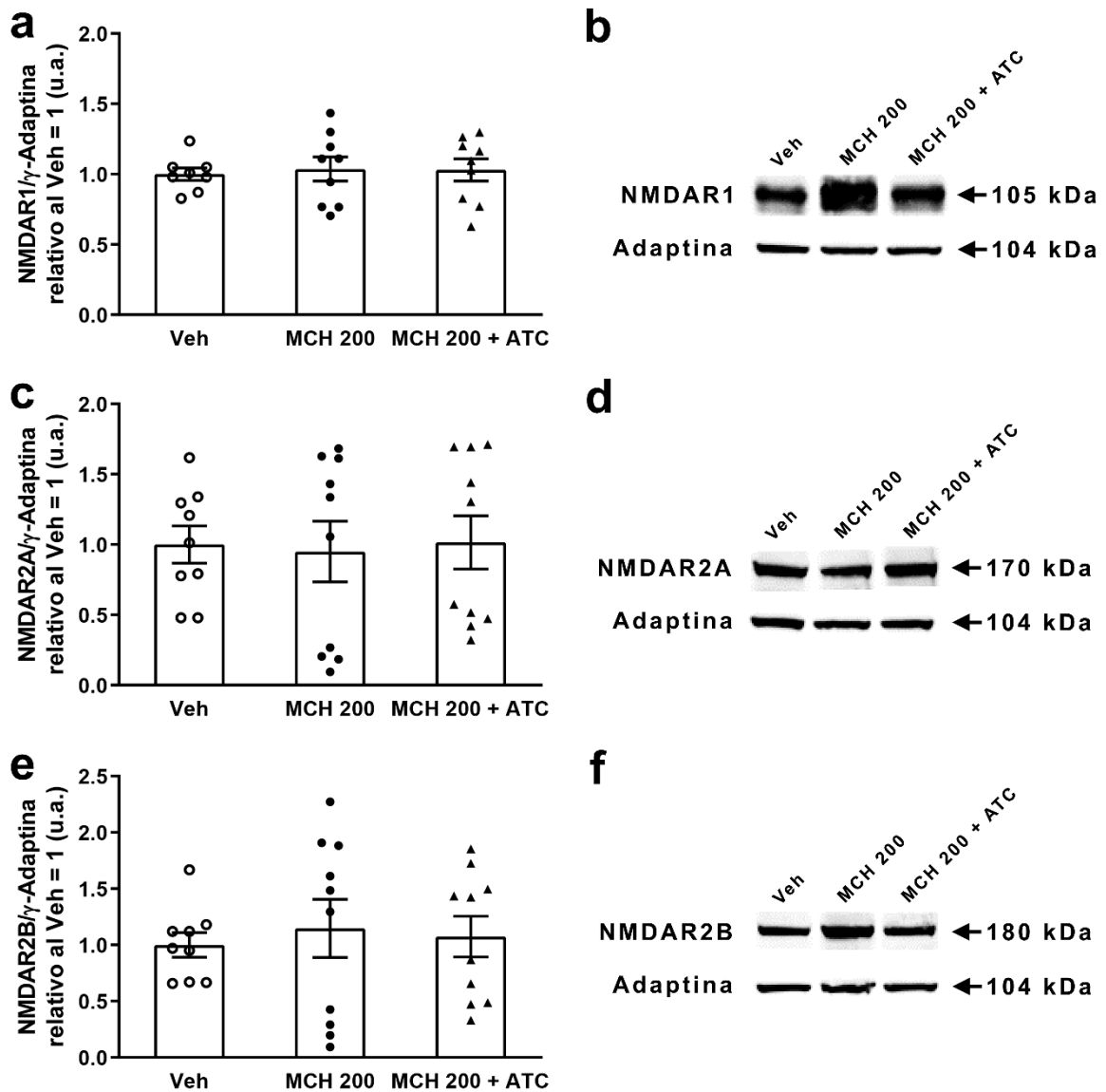


Fig. 18. Efectos de la administración intra-hipocámpal de Veh, MCH 200 ng, MCH (200 ng) + ATC (1 mM) sobre la expresión de NMDAR1 (Grin1), NMDAR2A (Grin2a) y NMDAR2B (Grin2b). **a, c y e:** niveles de expresión de NMDAR1, NMDAR2A y NMDAR2B en el hipocampo de ratas inyectadas con vehículo (n = 8 para NMDAR1, n = 9 para NMDAR2A, y n = 9 para NMDAR2B), MCH 200 ng (n = 9 para NMDAR1, n = 10 para NMDAR2A, y n = 10 para NMDAR2B) o co-administrada con MCH 200 ng + 1 mM de ATC (n = 9 para NMDAR1, n = 10 para NMDAR2A, y n = 10 para NMDAR2B). **b, d y f:** inmunoblots representativos para cada grupo de cada proteína de interés con su respectivo control (γ -Adaptina). Se eliminaron aquellos valores de las proteínas de interés relativizadas al control de carga que estuviesen por encima o debajo de 2 desvíos estándar de la media. Luego, se procedió a normalizar todos los valores restantes (incluidos los del propio grupo Veh) a la media del grupo Veh que se estableció arbitrariamente en 1. Los resultados se muestran como puntos de dispersión con la media \pm error estándar de la media superpuesto.

En cuanto a los niveles proteicos de BDNF los resultados no permiten observar un cambio significativo en su expresión en ninguno de los tres grupos experimentales (Fig. 17f y

19e y f). Sin embargo, al analizar la expresión proteica de TrkB y MCHR-1, fue posible observar una disminución significativa en la expresión de TrkB y MCHR-1 luego de la administración intra-hipocampal de MCH (200 ng) en comparación con el grupo tratado con vehículo (TrkB: $F_{(2, 24)} = 4.75$, $p = 0.018$; post-hoc test MCH 200 vs. Veh: $p = 0.014$; MCHR-1: $F_{(2, 24)} = 5.88$, $p = 0.008$; post-hoc test MCH 200 vs. Veh: $p = 0.007$)(Fig. 19a-d). En contrapartida, aquellos grupos co-tratados con ATC y MCH demostraron niveles de expresión similares a los observados para el grupo control y tratados con MCH a 200 ng ($p = n.s.$ post-hoc) (Fig. 19a-d).

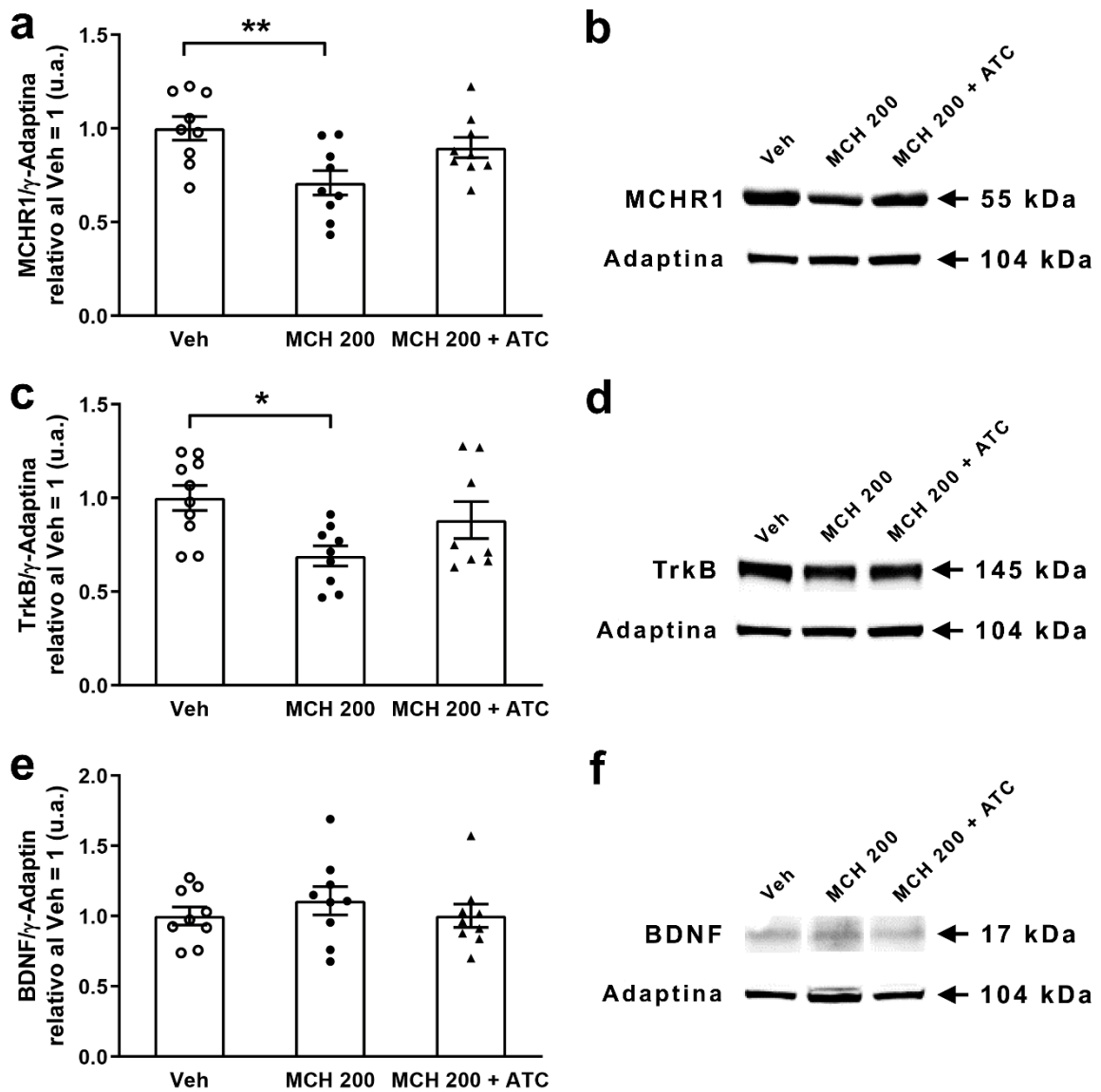


Fig. 19. Efectos de la administración intra-hipocampal de Veh, MCH (200 ng) o MCH (200 ng) + ATC (1 mM) sobre la expresión de MCHR-1, BDNF y TrkB. a, c y e: niveles de expresión de MCHR-1, TrkB, y BDNF en el hipocampo de ratas inyectadas con vehículo (n= 9 para MCHR-1, n = 10 para TrkB, y n = 9 para BDNF), MCH 200

ng (n = 9 para MCHR-1, n = 9 para TrkB, y n = 9 para BDNF) o co-administrada con 1mM ATC + MCH 200 ng (n = 9 para MCHR-1, n = 8 para TrkB, y n = 9 para BDNF). Post-hoc test: ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$. **b, d y f**, inmunoblots representativos para cada grupo de cada proteína de interés con su respectivo control (γ -Adaptina). Se eliminaron aquellos valores de las proteínas de interés relativizadas al control de carga que estuviesen por encima o debajo de 2 desvíos estándar de la media. Luego, se procedió a normalizar todos los valores restantes (incluidos los del propio grupo Veh) a la media del grupo Veh que se estableció arbitrariamente en 1. Los resultados se muestran como puntos de dispersión con la media \pm error estándar de la media superpuesto.

Con el fin de comprender qué implicancia funcional presentaron los resultados descritos anteriormente, se realizó una correlación entre la expresión proteica de TrkB y MCHR-1 con la relación de discriminación obtenida (d2) a partir de la prueba NORT. Dicho análisis demuestra una correlación significativa y directa entre la expresión de ambos receptores y d2 (TrkB: $r^2 = 0.140$, $p = 0.05$; MCHR-1: $r^2 = 0.249$, $p = 0.008$) (Fig. 20d y e). Por otra parte, y en coherencia con resultados anteriores, no se observó correlación entre d2 y BDNF ni para las subunidades de los receptores NMDA (Fig. 20a-c y f).

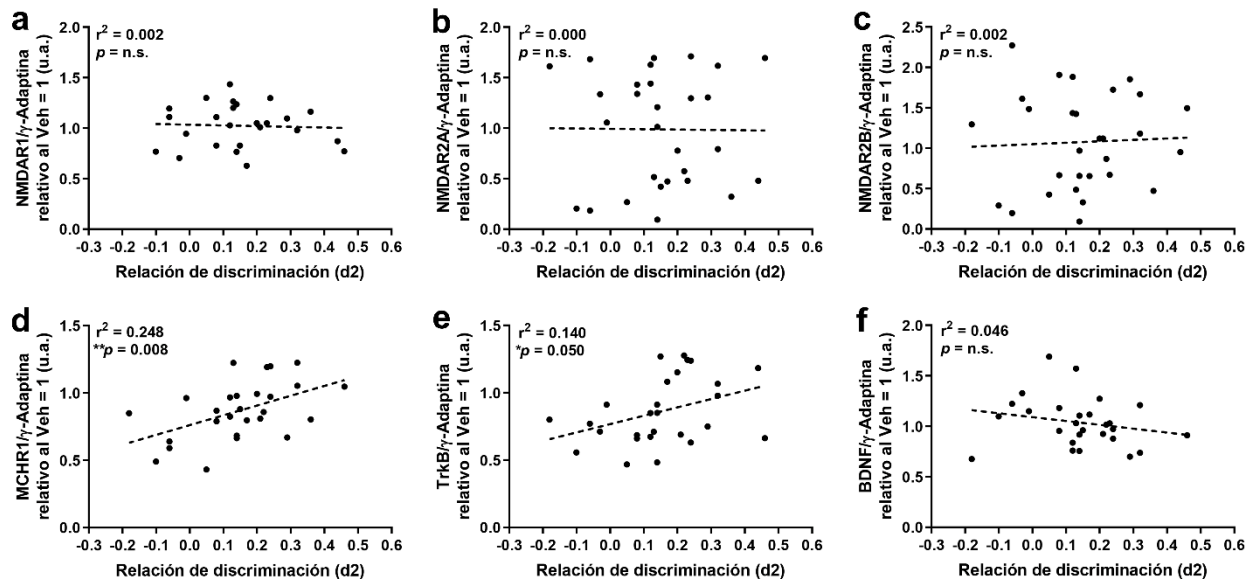


Fig. 20. Correlaciones entre la expresión proteica hipocampal y la relación de discriminación (d2). No se observó correlación entre **(a)** NMDAR1 (n = 26), **(b)** NMDAR2A (n = 29), **(c)** NMDAR2B (n = 29), **(f)** BDNF (n = 27) y valores de d2. En contraste, se observó una correlación directa y significativa entre los niveles de los receptores **(d)** MCHR-1 (n = 27) y **(e)** TrkB (n = 27) y los valores de d2.

6.6. Tratamiento crónico i.c.v. con MCH o vehículo aplicado al modelo de EA por administración i.c.v. de estreptozotocina

6.6.1. Efectos en el NORT

Considerando los resultados obtenidos con la administración intra-hipocampal aguda de MCH, se procedió a estudiar qué efectos tendría la MCH administrada de forma crónica por vía i.c.v. utilizando microbombas osmóticas en el modelo de EA inducido por la administración i.c.v de estreptozotocina.

En aquellos grupos en donde se administró vehículo de forma crónica utilizando las microbombas y con un tratamiento previo con LCR artificial, los tiempos de exploración para el ON fueron significativamente mayores a los 5 minutos de ensayo de retención luego de 14 días de tratamiento con vehículo (ON: $54,33 \pm 4,65$ segs.; OF: $41,72 \pm 2,87$ segs.; Fig. 21A). Por otra parte, no se observaron diferencias significativas entre los tiempos de exploración del ON y OF en animales tratados con MCH durante 14 días (ON: $42,78 \pm 2,77$ segs.; OF: $36,72 \pm 3,53$ segs.; Fig. 21A). Los valores de d2 obtenidos para cada grupo experimental coinciden con lo obtenido en los tiempos de exploración. A los 14 días, los animales tratados con vehículo (y pre-tratados con LCR) obtuvieron valores indicativos de una significativa discriminación del ON ($0,12 \pm 0,04$; Fig. 21B). Por el contrario, los animales tratados con MCH (y pre-tratados con LCR) no fueron capaces de discriminar el ON del OF, presentando valores de d2 cercanos a 0 ($0,08 \pm 0,05$; fig. 21B).

Al repetir la prueba 30 días luego de iniciado el tratamiento crónico, fue posible observar que los animales tratados con vehículo no presentaron diferencias significativas en los tiempos de exploración de ON y OF a los 5 minutos del ER ($47,11 \pm 5,27$ segs. y $35,72 \pm 2,78$ segs., respectivamente; Fig. 21C), al igual que lo observado para los animales tratados con MCH (el mismo patrón observado a los 14 días de tratamiento; ON: $36,25 \pm 4,17$ segs.; OF: $34,56 \pm 3,01$ segs.; Fig. 21C). A los 30 días y siguiendo el patrón observado en los tiempos de exploración, ni el grupo vehículo ni el tratado con MCH, pre-tratados con LCR, fueron capaces de discriminar el ON del OF ($0,12 \pm 0,05$ y $0,01 \pm 0,04$, respectivamente; Fig. 21D).

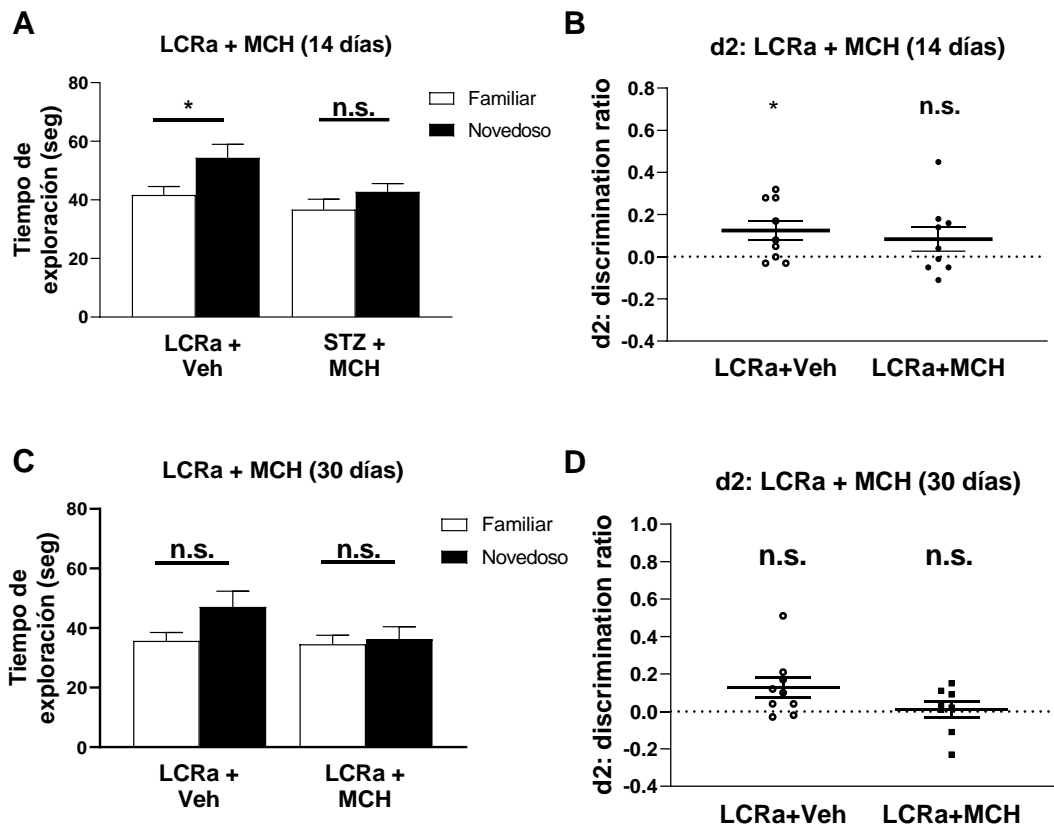


Fig. 21. Prueba de reconocimiento del objeto novedoso en el ensayo de retención, 14 y 30 días luego de iniciado el tratamiento crónico con vehículo (NaCl 0,9%) o MCH (200 ng) en animales pre-tratados con LCR. **A y C:** Tiempo de exploración del objeto familiar y novedoso durante el ensayo de retención en animales tratados durante 14 días y 30 días luego de iniciado el tratamiento crónico con Veh (n = 9) o MCH 200 ng (n = 9) en animales pre-tratados con LCR relación de discriminación para ambos grupos experimentales. * $p < 0,05$ test de t-pareado (dos colas). **B y D:** Relación de discriminación durante el ensayo de retención en animales 30 días post-STZ con Veh (A, n = 9) o MCH 200 ng (B, n = 9), pre-tratados con LCR. * $p < 0,05$; comparado con un valor medio hipotético de cero (test de t de una muestra a dos colas); n.s., no significativo.

Luego de analizar los resultados observados para los tratamientos crónicos con vehículo o MCH con LCRA, se evaluaron los efectos de dichos tratamientos en combinación con el modelo de aplicación de 3 mg/Kg de estreptozotocina (STZ). En estos grupos, la administración de STZ se realizó previamente a la implantación de la microbomba. Como en los grupos descritos anteriormente, dos instancias de la prueba NORT se realizaron a los 14 y 30 días de implantadas las microbombas.

A los 14 días de tratamiento, aquellos grupos que fueron pre-tratados con STZ y recibieron vehículo en forma crónica, no presentaron tiempos de exploración para el ON y OF significativamente diferentes a los 5 minutos del ER (ON: $38,39 \pm 4,27$ segs.; OF: $32,06 \pm 2,75$ segs.; Fig. 22A). Por otro lado, los grupos tratados por 14 días con MCH y previamente tratados con STZ, presentaron diferencias significativas entre los tiempos de exploración para ON y OF (ON: $56,04 \pm 4,53$ segs.; OF: $34,42 \pm 3,57$ segs.; Fig. 22A). A los 30 días, se observaron los mismos patrones, tanto para el grupo vehículo como para el grupo tratado con MCH (Veh, ON: $61 \pm 7,53$ segs.; OF: $44,67 \pm 8,15$ segs; Fig. 22C; MCH, ON: $41,71 \pm 3,29$ segs.; OF: $27,88 \pm 2,56$ segs.; Fig. 22C).

Para estos grupos experimentales a los 14 días, la relación de discriminación para el grupo tratado crónicamente con vehículo y STZ presentó un índice significativo, demostrando una marcada discriminación del objeto novedoso ($0,15 \pm 0,03$; Fig. 22B). Por otra parte, el grupo tratado con STZ y MCH de forma crónica exhibió una discriminación más fuerte durante el ensayo de retención ($0,24 \pm 0,05$; Fig. 26B). A los 30 días luego de iniciado el tratamiento crónico con vehículo, la discriminación de los animales de este grupo experimental no presentó diferencias significativas, a diferencia de lo observado a los 14 días ($0,18 \pm 0,09$; Fig. 22B). En el grupo experimental pre-tratado con STZ y MCH crónica, la discriminación de los objetos a los 30 días se volvió a mostrar marcada tal como ocurrió a los 14 días ($0,20 \pm 0,05$; Fig. 22D).

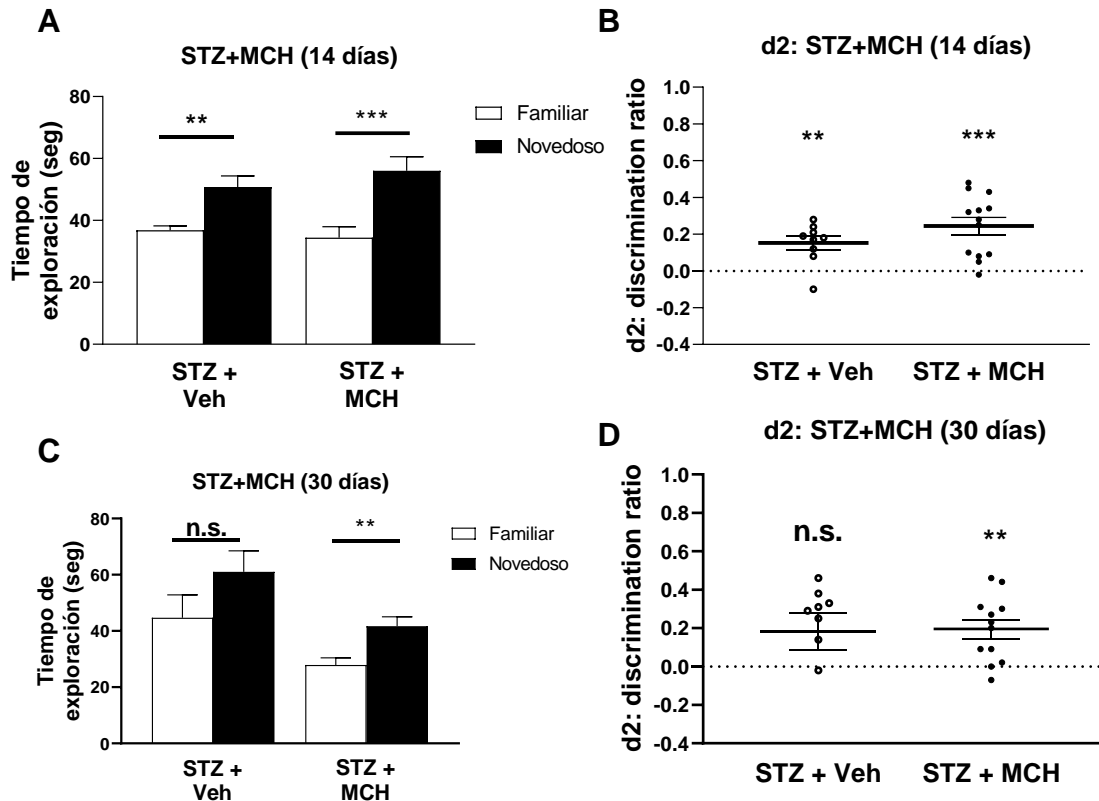


Fig. 22. Prueba de reconocimiento del objeto novedoso en el ensayo de retención, 14 y 30 días luego de iniciado el tratamiento crónico con vehículo (NaCl 0,9%) o MCH (200 ng) en animales pre-tratados con STZ (3 mg/Kg). **A y C:** Tiempo de exploración del objeto familiar y novedoso durante el ensayo de retención en animales tratados durante 14 días y 30 días luego de iniciado el tratamiento crónico con Veh (n = 9) o MCH 200 ng (n = 12) en animales pre-tratados con LCR relación de discriminación para ambos grupos experimentales. **p<0,01, ***p<0,001 test de t-pareado (dos colas). **B y D:** Relación de discriminación durante el ensayo de retención en animales 30 días post-STZ con Veh (A, n = 9) o MCH 200 ng (B, n = 12), pre-tratados con STZ. **p<0,01, ***p<0,001 comparado con un valor medio hipotético de cero (test de t de una muestra a dos colas); n.s., no significativo.

6.6.2. Control de peso e ingesta de alimento

El monitoreo del peso corporal de las ratas durante los 30 días a partir de la implantación de las microbombas osmóticas no demostró diferencias significativas entre grupos experimentales a excepción de diferencias significativas entre el grupo tratado con MCH crónica y el grupo pre-tratado con STZ+MCH crónica (fig. 23).

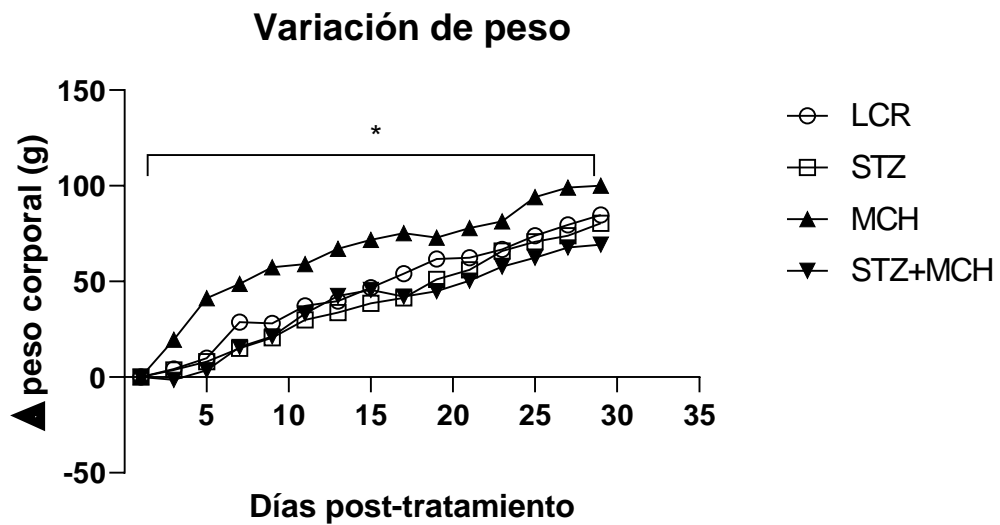


Fig. 23. Variación de peso corporal durante y luego de tratamiento crónico con MCH. El peso corporal está expresado como la diferencia en el peso por día respecto al peso al inicio del tratamiento. El análisis estadístico fue realizado por ANOVA de una cola con medidas repetidas (días). *, $p < 0,05$. MCH vs STZ+MCH.

7. DISCUSIÓN

En la presente Tesis de Doctorado se evaluaron los efectos de la MCH sobre la memoria al ser administrada de forma aguda en el hipocampo de ratas, los efectos de acuerdo a la dosis administrada y su dependencia del receptor de MCH, el MCHR-1. También se evaluaron los efectos de dicho neuropéptido al ser administrado de forma crónica en condiciones fisiológicas y patológicas emuladas por el pre-tratamiento de las ratas con STZ, un modelo intervencionista ampliamente utilizado para estudiar procesos patológicos similares a los observados para la EA.

7.1. Puesta a punto de las pruebas comportamentales

Los resultados obtenidos en la puesta a punto de las pruebas de comportamiento demostraron resultados coherentes y con patrones definidos en base a las condiciones controladas de las pruebas. Dichas observaciones y procedimientos demostraron ser confiables para la posterior evaluación de grupos experimentales sometidos a los tratamientos farmacológicos especificados en la presente tesis. Tanto para el NORT como para el LCEm, la puesta a punto logró reproducir los patrones esperados para animales que no recibieron ningún tratamiento, demostrando robustez en los ensayos y condiciones adecuadas para su ejecución (Bevins and Besheer, 2006; Ennaceur y cols., 2005; Itoh y cols., 1990).

Respecto a la prueba de NORT los distintos ITIs evaluados en la puesta a punto, permitieron identificar aquellos tiempos en donde los efectos del tratamiento agudo con MCH (comparado con su respectivo vehículo) podían exhibir tendencias sobre la capacidad de discriminación de los animales entre los objetos novedosos y familiares. A diferencia de otras pruebas comportamentales que evalúan la memoria y han sido utilizados para estudiar a la MCH, la prueba NORT no requiere un entrenamiento previo de los animales de experimentación, lo cual permite acortar los tiempos de experimentación, ni se apoya en la necesidad de factores motivacionales externos como recompensas o castigos (Bevins & Besheer, 2006; Ennaceur & Delacour, 1988; Mutlu-Burnaz y cols., 2022). Pruebas como el laberinto acuático de Morris o el test de esquiva pasiva, si bien han servido para evaluar los efectos de la MCH sobre la memoria, implican exponer al animal a estímulos aversivos, lo cual puede afectar directamente la función que se quiere estudiar (M. E. Monzón & De Barioglio,

1999; Oh y cols., 2019). Estas pruebas comportamentales, al tener componentes ansiogénicos, podrían dificultar el estudio de la memoria ya que las condiciones experimentales traerían el peso de otras estructuras participantes en la formación de memorias, volviendo más compleja la interpretación de los resultados (Cohen and Stackman, 2015). Se ha discutido sobre la variedad de condiciones experimentales aplicadas para el NORT y como estas pueden causar la obtención de resultados diferentes a los reportados desde otros laboratorios bajo las mismas condiciones (Cohen and Stackman, 2015). Considerando que la prueba NORT se apoya sobre la atracción de los roedores por la novedad, sin la necesidad de condiciones aversivas para el animal, permite un análisis sencillo de los resultados obtenidos (Ennaceur, 2010; Zaki y cols., 2003).

En la puesta a punto del Laberinto en Cruz Elevado modificado (LCEM), se observaron patrones típicos de animales controles o “sham”. En estos grupos experimentales, se espera que, a lo largo de los tres días de la prueba, las latencias de transferencia disminuyan de forma progresiva, siendo mayor en el día 1, respecto a los dos días posteriores (Estanislau y cols., 2011; Hill y cols., 2015; Hlíák & Krejčí, 2002). La observación de dicho patrón en la puesta a punto de la prueba en el cuarto de comportamiento del laboratorio donde se desarrolló la presente tesis, demuestra que las condiciones para la ejecución de la prueba comportamental fueron adecuadas para su posterior aplicación en los distintos grupos experimentales de interés.

7.2. Tratamiento intra-hipocampal agudo con MCH

Los resultados de administración aguda de MCH demuestran que la MCH a dosis altas es capaz de afectar la consolidación de la memoria en las dos pruebas comportamentales seleccionadas para la presente tesis.

Estudios recientes han evidenciado el rol de la MCH en la actividad exploratoria y de reconocimiento de un objeto novedoso (Izawa y cols., 2019; Kosse & Burdakov, 2019). Kosse y Burdakov (2019) describieron en modelos murinos que la activación de neuronas MCHérgicas en el HL tras el silenciamiento por optogenética de la enzima glutamato decarboxilasa (GAD65) presentes en microcircuitos de dicho núcleo hipotalámico, es necesaria para que exista reconocimiento de los objetos novedosos (Kosse & Burdakov, 2019). Es importante destacar que la MCH co-localiza con neuronas GABAérgicas en el HL, por lo cual el

sistema MCHérgico puede ser estudiado a través de la manipulación de los circuitos GABAérgicos en dicho núcleo hipotalámico. Se ha discutido ampliamente sobre el rol regulatorio de dichos circuitos sobre la liberación de MCH en otras estructuras del encéfalo permitiendo contemplar al sistema GABAérgico hipotalámico como un participante de la regulación de los circuitos MCHérgicos y las funciones que estos regulan (Chee y cols., 2013; Del Cid-Pellitero & Jones, 2012; Neugebauer y cols., 2018). Por otra parte, otros estudios han indicado que la inhibición de neuronas MCHérgicas mediante el método DREADD (del inglés, *Designer Receptor Exclusively Activated by Designer Drug*) no presenta efectos favorables ni negativos sobre el proceso de reconocimiento de objetos novedosos (Mutlu-Burnaz y cols., 2022). En contrapartida, otros estudios realizados por Izawa y cols. (2019), demostraron que inhibiendo específicamente poblaciones de neuronas MCHérgicas activas durante el sueño REM, la consolidación de la memoria es favorecida, mientras que la inhibición de aquellas neuronas MCHérgicas activas durante el sueño NREM, no genera los mismos efectos (Izawa y cols., 2019). Los resultados obtenidos en los experimentos de administración intra-hipocampal aguda de MCH demostraron que al administrar dosis de 200 y 500 ng de dicho neuropéptido, la consolidación de la información se vio afectada, exhibiendo un efecto amnésico del tratamiento agudo con MCH. Estos resultados coinciden con las conclusiones obtenidas por Izawa y cols. (2019) respecto a la MCH como un factor capaz de interferir con la formación de memorias y la capacidad de los animales tratados con MCH de reconocer el objeto novedoso durante la prueba NORT. Los autores proponen a la MCH como un neuropéptido capaz de promover el olvido de memorias hipocampo-dependientes. Las neuronas MCHérgicas activas durante el sueño REM podrían estar influyendo sobre la actividad de neuronas presentes en el hipocampo, responsables de la consolidación de memorias obtenidas durante la fase de vigilia. Grosmark y cols. (2012) describen como la caída en la frecuencia de disparo de las neuronas piramidales e interneuronas hipocampales actúe como un proceso de eliminación de información irrelevantes para la consolidación de memorias de trabajo (Grosmark y cols., 2012). En estudios de optogenética capaz de modular la actividad de las neuronas MCHérgicas del hipotálamo, Izawa y cols. (2019) también evidenciaron que su inhibición mejoró la memoria espacial en el laberinto acuático de Morris (Izawa y cols., 2019). Concetti y cols. (2020) demostraron en la prueba de *fear conditioning* que la inhibición de neuronas MCHérgicas es capaz de enlentecer la extinción de comportamientos asociados a miedo exacerbado, revelando a la MCH como un posible

modulador de la formación de memorias emocionales capaces de disminuir dichos comportamientos (Concetti y cols., 2020). Noble y cols. (2019) han reportado la actividad de neuronas MCHérgicas aferentes al hipocampo ventral (específicamente CA1) como un agente influyente de comportamientos impulsivos asociados a estímulos con carga emocional presente (Noble y cols., 2019). Las evidencias experimentales obtenidas por Izawa y cols. (2019) y Concetti y cols. (2020), si bien son contradictorias, podrían explicarse en base a la amplia difusión del sistema MCHérgico hacia todo el SNC desde el HL, encontrando fibras nerviosas de dicho neuropéptido hipotalámico en múltiples estructuras nerviosas. Por tal motivo, es posible inferir que la MCH es capaz de modular el proceso de formación de memoria, pero su efecto dependerá de las estructuras que están involucradas en dicho fenómeno y en el tipo de información asociado a dicha memoria (Antunes and Biala, 2012). Particularmente el hipocampo ha sido asociado a múltiples procesos en la formación de memorias como por ejemplo la consolidación y la evocación de memorias (Iwamura y cols., 2016; Villar y cols., 2017). En relación a este punto, es importante destacar que se ha descrito que la MCH actúa a través de la activación del único receptor funcional presente en roedores y mamíferos: el MCHR-1 (Presse y cols., 2014; Saito y cols., 2001). Está descrito que dicho receptor se encuentra acoplado a distintas proteínas G (Chung y cols., 2009a; Hawes y cols., 2000). Por lo tanto, tras su internalización, distintas cascadas de segundos mensajeros intracelulares pueden activarse generando distintos efectos a nivel post-sináptico, pudiendo activar o inhibir las neuronas receptoras a la MCH. Debido a que los estudios a partir de los cuales se describieron estas características para el MCHR-1 fueron realizados principalmente en modelos *in vitro* en sistemas heterólogos de sobreexpresión del receptor, no se sabe específicamente a qué proteína G se encuentra acoplado el receptor en las neuronas del hipocampo (estructura en la cual se administró la MCH para la presente tesis). Futuros experimentos podrían ser diseñados para contestar esta interrogante, pero hasta el presente la falta de estudios electrofisiológicos *in vivo* hace imposible que haya evidencias que demuestren el mismo funcionamiento del receptor. Gao y Van den Pol (2002) lograron determinar, en rodajas de hipotálamo que la MCH es capaz de inhibir las corrientes de Ca^{2+} L, N y P/Q, lo cual es capaz de producir una inhibición a nivel post-sináptico en neuronas hipotalámicas, inhibiendo la liberación tanto de glutamato como de GABA (Gao & Pol, 2002, 2001). Apoyándose en estas evidencias, resta determinar si en el hipocampo la MCH podría estar actuando a través del mismo proceso. De ser así, la influencia de la MCH sobre el sistema

glutamatérgico y GABAérgico que inerva el hipocampo podría ser un factor esencial en la modulación de la memoria. Estudios como el realizado por Harris & Burdakov (2024) discuten sobre la capacidad de la MCH de facilitar los fenómenos de plasticidad sináptica a nivel hipocampal gracias a una disminución de del umbral sináptico (Harris and Burdakov, 2024). La evidencia presentada por los autores se condice con estudios previos donde la actividad MCHérgica se vio afectada en modelos transgénicos *knock-out* para el receptor MCHR-1 dificultó la generación tanto de LTP como de LTD (Pachoud y cols., 2010). Previamente, Adamantidis y cols. (2005) evidenciaron que el modelo transgénico *knock-out* para MCHR-1 no solo es capaz de inducir déficits cognitivos posiblemente influyendo sobre la actividad sináptica glutamatérgica del hipocampo interfiriendo en la expresión génica de subunidades clave para el correcto funcionamiento de receptores NMDA (Adamantidis y cols., 2005). Sabiendo sobre la participación de fenómenos de LTP y LTD en el reconocimiento de objetos novedosos durante el ensayo de NORT, es posible que, dado nuestro diseño experimental, los tratamientos de MCH a 200 y 500 ng puedan estar causando una desensibilización del sistema MCHérgico en el hipocampo, interfiriendo con la retención de memorias adquiridas durante los ensayos comportamentales.

Estudios anteriores han descrito que la MCH es capaz de incrementar la latencia en la prueba de esquiva inhibitoria cuando se administra en el hipocampo, influyendo en la capacidad de neuronas de dicha estructura de generar LTP y por cambios en la expresión de subunidades de los receptores NMDA (Varas y cols., 2002, 2003). Sin embargo, otros estudios describieron que la MCH al ser administrada en estructuras como la amígdala, presentó un perfil amnésico (M E Monzón & De Barioglio, 1999; Varas y cols., 2002). . La diferencia en los efectos observados en la presente tesis con los descritos en trabajos anteriores como el de Varas y cols. (2002 y 2003) puede ser producto de diferencias en las condiciones experimentales. Es un detalle importante mencionar que varios de los experimentos realizados por este equipo fueron realizados en modelos *in vitro* mientras que para los experimentos *in vivo* se realizaron ensayos comportamentales distintos a los aplicados en la presente tesis de doctorado (Varas y cols., 2002). Una de estas diferencias resalta en el trabajo de Varas y cols. (2003) en donde condiciones experimentales como la concentración de MCH empleada (500 ng/uL) y el momento durante el ensayo de comportamiento donde se realizó su inyección (después de la fase de entrenamiento) (Varas y cols., 2003). A pesar de haber

reproducido las mismas condiciones de inyección, el efecto del tratamiento fue opuesto al reportado por Varas y cols. (2003). Los resultados obtenidos pueden ser producto de que el ensayo comportamental aplicado no solo es distinto al utilizado por Varas y cols. sino que también el ensayo de NORT es sensible a numerosas condiciones experimentales, obteniendo una diversidad amplia de resultados que dificultan la interpretación sobre los efectos de la MCH sobre el reconocimiento de los objetos.

Si bien en la presente tesis nos centramos en primera instancia en evaluar los efectos agudos de la MCH solamente en el hipocampo y no en estructuras que participen en la formación de memorias emocionales, fue posible observar distintos efectos de la MCH dosis-dependiente. Con el tratamiento de 50 ng de MCH no se observó un efecto sobre el desempeño de los animales en las pruebas NORT y LCEm, patrón que también se observó en los animales tratados con vehículo A nivel de la prueba NORT no se observaron diferencias en la discriminación de los objetos novedoso y familiar. En cambio, con el tratamiento de 25 ng de MCH, la discriminación del objeto novedoso fue significativamente mayor en comparación con el vehículo. Dicho patrón es acorde a estudios previos en los que se evidencia la capacidad de los neuropéptidos de ejercer efectos a pequeñas cantidades (Salio y cols., 2006). Salio y cols. (2006) afirman que dicha capacidad de los neuropéptidos se debe a su gran afinidad por sus receptores y a su vida media superior en comparación con los neurotransmisores tradicionales (Salio y cols., 2006; Zhang y cols., 2010). Estudios realizados por Urbanavicius y cols. (2014) evidenciaron los efectos pro-depresivos de la MCH administrada en el Núcleo Dorsal del Rafe siendo más notorios dichos efectos con dosis intermedias. Esto se demostró con el test de nado forzado (TNF) en donde cantidades intermedias de MCH indujeron el mayor tiempo de inmovilidad en comparación con las cantidades mínimas y máximas empleadas en el estudio (Urbanavicius y cols. (2014)). El patrón observado para este grupo experimental se alinea con numerosas evidencias reportadas en la bibliografía a partir de las cuales la MCH es propuesta como un agente potenciador de la memoria (Varas y cols., 2002, 2003). Por otro lado, cantidades mayores (200 y 500 ng) fueron capaces de interferir posiblemente con la consolidación de la memoria siendo imposible que esta condicione el desempeño de los animales frente a un objeto o espacio conocido. Los patrones observados en estos experimentos, se alinean con lo descrito por Izawa y cols. (2019), reafirmando el rol de la MCH en fenómenos de “olvido”. Autores como Kosse & Burdakov (2019) proponen que

este perfil amnésico de la MCH podría estar sujeto a la modulación de circuitos colaterales como el sistema GABAérgico y glutamatérgico hipocampal así como también en qué momento de la formación de memorias interviene la MCH (Kosse & Burdakov, 2019). Respecto al momento en que se aplica el tratamiento farmacológico durante el ensayo de NORT, estudios realizados por Cohen y cols. (2013) inactivando el hipocampo dorsal con una inyección intra-hipocampal de muscimol (agonista GABAérgico) en distintas etapas del ensayo NORT, logró exhibir los mismos efectos sobre el desempeño de los ratones (Cohen y cols., 2013). Los autores concluyen que no existieron diferencias en relación al momento de la inyección, lo cual podría dar a entender que dicha variable no es determinante para los procesos de reconocimiento que ocurren a nivel del hipocampo, sino también sobre la importancia del control GABAérgico sobre dichos fenómenos (Chao y cols., 2018). Dicho sistema de neurotransmisión, como ya se mencionó anteriormente, puede estar siendo influenciado por la neurotransmisión MCHérgica. Es sabido que neuronas MCHérgicas también son capaces de liberar glutamato y GABA (Kosse and Burdakov, 2019b). En los experimentos realizados por Cohen y cols. (2013), se evidenció que la activación del sistema GABAérgico a nivel hipocampal (independientemente de cuándo se aplicó el tratamiento con muscimol), fue capaz de interferir con el reconocimiento del objeto novedoso. Respecto a la neurotransmisión glutamatérgica en el hipocampo, Rossato y cols. (2023) pusieron en evidencia utilizando el ensayo de NORT el rol que cumplen las distintas subunidades de los NMDAR sobre los fenómenos de memoria. Aplicando inyecciones intra-hipocampales en CA1 dorsal de antagonistas no-específicos y específicos para las subunidades N2A y N2B de los NMDARs. Los autores describen que aquellos receptores conteniendo las subunidades N2A participan en fenómenos de consolidación y reconsolidación de la memoria, mientras que aquellos receptores conteniendo la subunidad N2B son importantes para procesos de desestabilización de la memoria (Rossato y cols., 2023). La expresión de dichas subunidades de los NMDARs fue descrita por Varas y cols. (2003) como sensibles a la acción de la MCH, la cual es capaz de aumentar su expresión a nivel hipocampal facilitando la ocurrencia de fenómenos de plasticidad sináptica (Rossato y cols., 2023; Varas y cols., 2003). En relación a los resultados obtenidos en la presente tesis, es posible que las cantidades de MCH empleadas para los tratamientos agudos hayan sido suficientes para causar una desensibilización no solo del sistema MCHérgico hipocampal, sino también del glutamatérgico.

Para evidenciar que los efectos observados ante la aplicación de MCH eran dependientes específicamente de su receptor, se evaluaron estos efectos en experimentos de administración de un antagonista del MCHR-1: el único receptor funcional de MCH en roedores. El tratamiento con dicho antagonista (ATC-0175 a dosis ya reportadas como capaces de antagonizar los efectos de la MCH) previo a la administración de MCH, en nuestras condiciones de trabajo, fue capaz de bloquear los efectos amnésicos ejercidos por dicho neuropéptido evidenciado en una discriminación significativa entre el objeto familiar y novedoso a pesar de haber recibido una dosis de 200 ng de MCH (dosis que en experimentos previos demostró ser pro-amnésica). Por estos resultados, es posible sugerir que los efectos de la MCH, observados en la prueba NORT, son dependientes de la activación del MCHR-1. Esta reversión de los efectos de la MCH sobre la memoria se suma al potencial del ATC-0175 de revertir los efectos de la MCH sobre otras funciones moduladas por esta, como son el ciclo sueño-vigilia o el estado de ánimo (Lagos y cols., 2009; Urbanavicius y cols., 2014). Aparte de los efectos evaluados en esta tesis, otros estudios han evaluado la capacidad del ATC-0175 de antagonizar otros efectos reportados para la MCH. Chaki y cols. (2005) propusieron al ATC-0175 como un agente terapéutico para el tratamiento de la depresión y ansiedad debido a que se pusieron en evidencia los efectos pro-depresivos de la MCH (Chaki y cols., 2005b, 2005a). También se ha descrito a dicho fármaco como capaz de interferir con las funciones reguladoras de la MCH sobre el ciclo sueño-vigilia y la ingesta de alimento. Particularmente, el ATC-0175 ha sido destacado entre otros antagonistas para el MCHR-1 ya que no presenta efectos sobre la actividad locomotora espontánea, entre otros efectos no deseados a nivel del SNC (Johansson, 2016; Shimazaki y cols., 2006). A favor de estas ventajas de dicho antagonista, Chung y cols. (2011) remarcan que la administración aguda y crónica de ATC-0175 y otros antagonistas por vía oral, presentan efectos ansiolíticos frente a estímulos comúnmente estresores en roedores, como en el test de transición de luz-oscuridad o la interacción social con ratas desconocidas (Chung y cols., 2011). A nivel celular, Ruiz-Viroga y cols. (2021) utilizando MCH conjugada con rodamina (R-MCH), demostraron que la internalización de MCH por parte de neuronas presentes en el hipocampo, núcleo dorsal del rafe y núcleo septolateral, entre otras estructuras, es un proceso dependiente de MCHR-1 y es realizado por endocitosis dependiente de clatrina (Ruiz-Viroga y cols., 2021).

El presente trabajo logró demostrar efectos pro-amnésicos de la MCH al administrar de forma aguda e intra-hipocampalmente en dos ensayos de comportamiento destinados para evaluar la función de memoria episódica (NORT y LCEm). Ambas pruebas comportamentales evalúan procesos de formación de memoria dependientes del hipocampo (Antunes & Biala, 2012; Cohen & Stackman, 2015). Además de observar tales efectos, se demostró que éstos son dosis-dependiente y que la participación del receptor MCHR-1 a nivel hipocampal es un requisito para evocarlos. Los efectos generados por los mismos tratamientos agudos con MCH intra-hipocampal a 200 y 500 ng fueron amnésicos tanto en el NORT como en el LCEm. El hecho de haber observado los mismos patrones para ambos ensayos comportamentales aporta solidez a los resultados descritos para esta parte de la tesis. Por otro lado, mientras que el tratamiento con MCH aguda a 50 ng no presentaron diferencias con los controles utilizados, el patrón de discriminación observado en el ensayo de NORT para el tratamiento con 25 ng de MCH intra-hipocampal sugiere que el perfil del efecto de dicho neuropéptido esté sujeto a la dosis administrada. Futuros estudios son necesarios para demostrar que dichas cantidades administradas y el efecto ejercido, son producto de su influencia sobre la expresión de marcadores moleculares potenciadores de la memoria.

Estudios previos determinaron el efecto de la MCH en el hipocampo sobre la expresión de subunidades específicas de los receptores glutamatérgicos NMDA (Barnes y cols., 2020; Varas y cols., 2003). Dichos autores describen un aumento en la expresión de las subunidades NR1, NR2A y NR2B al aplicar un tratamiento de MCH intra-hipocampal en la etapa de consolidación durante el ensayo de esquivo inhibitoria. En el presente trabajo, los genes codificantes para dichas subunidades fueron contemplados junto con otros mediadores moleculares presentes en el hipocampo como el BDNF y su receptor, el TrkB, junto con el receptor MCHR-1. Específicamente se estudió la expresión de estos genes y proteínas 24 horas posteriores a la administración de MCH intra-hipocampal (realizada inmediatamente luego del ensayo de muestra del NORT) y una vez finalizado el ER, comparando los grupos experimentales que recibieron MCH y ATC+MCH con sus respectivos controles.

A diferencias de lo descrito en la bibliografía, para las subunidades NR1, NR2A y NR2B no fue posible observar diferencias significativas en la expresión génica o cantidad de proteína para estas subunidades bajo los efectos de la MCH o del ATC+MCH. Una posibilidad es que el tiempo del intervalo entre los ensayos de muestra y retención no haya sido adecuado para

que la MCH y/o el ATC-0175 influya sobre la expresión de dichos genes. Es sabido que la expresión de los distintos genes está sujeta a diversos procesos de regulación de expresión génica y requiere la participación de factores de transcripción, potenciadores y/o inhibidores y que dichos mecanismos se manifiestan de diferentes formas dependiendo del tipo celular en cuestión (Brouwer & Lenstra, 2019; De Jong y cols., 2019; Liu & Tjian, 2018). Cammarota y cols. (2000) estudiaron cambios en la expresión de las subunidades de los NMDARs NR1, NR2A y NR2B (Cammarota y cols., 2000). Empleando el ensayo de esquivia inhibitoria *step-down*, los autores describen un aumento de la expresión de la subunidad NR1 30 minutos luego de la sesión de entrenamiento, mientras que la expresión de subunidades NR2 no se vieron afectadas por el ensayo comportamental (Cammarota y cols., 2000). Al evaluar la expresión de dichas subunidades 120 minutos post-entrenamiento, no se observaron diferencias significativas respecto a los controles. Estos resultados sugieren que los cambios en la expresión de NR1 de los NMDAR es un fenómeno reversible. Es posible que los tiempos empleados en los protocolos de la presente tesis no hayan sido adecuados para evidenciar un aumento en la expresión de dichos marcadores moleculares. Considerando que los cerebros fueron disecados 24 horas luego de aplicado el tratamiento con MCH, es posible que la ventana temporal seleccionada haya sido demasiado amplia para poder observar un aumento de la expresión de *grin1* (gen codificante de la subunidad NR1). La diferencia en los ensayos comportamentales aplicados y las estructuras participantes en la formación de memorias a partir de éste, podría ser considerado un factor influyente sobre por qué no se observan cambios en la expresión de las subunidades de los NMDAR.

Una posible explicación ante las diferencias en los resultados sobre expresión génica obtenidos entre el presente trabajo y el realizado por Varas y cols. (2003) puede deberse al método de detección de expresión génica y las estructuras seleccionadas para el análisis de dichos genes. Esta tesis concentró su atención en estructuras hipocampales importantes en procesos cognitivos y de formación de memorias como son CA1, CA2 y CA3 y el giro dentado (Antunes & Biala, 2012; Chao y cols., 2020). Segundo, Varas y cols. utilizaron como método de detección la técnica de hibridación *in situ* mientras que este trabajo utilizó PCR en tiempo real para medir la expresión de los genes mencionados luego de distintos tratamientos farmacológicos. Ambas técnicas se han descrito como mutuamente complementarias pero la sensibilidad de la PCR en tiempo real como método de cuantificación de ARNm es superior a

la de hibridación *in situ* (Hua y cols., 2018; Ransick, 2004). Por dicha razón, no se descarta la posibilidad de que la PCR al ser más sensible, pueda ser más confiable que la hibridación *in situ*. Un factor determinante de estos resultados podría ser la cantidad de muestra empleada para medir la expresión de los genes. Es importante recordar que, para estos experimentos, se utilizó un punch de un corte grueso coronal de cerebro conteniendo ambos hipocampos a nivel de las microinyecciones de MCH, mientras que Varas y cols. midieron la expresión de las subunidades de NMDAR en regiones específicas del hipocampo y con otro método. Posiblemente haber disecado gran parte del hipocampo para estos estudios pueda estar enmascarando cambios en la expresión de genes vinculados a los receptores NMDA en CA1, CA2 y CA3.

En cuanto a la neurotrofina BDNF y su receptor, TrkB, importante modulador de la formación de memoria a nivel hipocampal, se observó que la administración de MCH no indujo modificaciones en los niveles de expresión de BDNF ni en sus niveles proteicos. Sin embargo, se pudo evidenciar una disminución de la expresión del receptor TrkB en animales tratados con MCH 24 horas luego del tratamiento. También fue posible observar una correlación positiva entre la expresión de TrkB y la relación de discriminación durante el NORT. Dicha observación fortalece la idea de los efectos deletéreos de la MCH sobre la memoria cuando esta se administra en dosis altas. Está ampliamente descrito que el factor BDNF es un mediador molecular de gran protagonismo en las distintas etapas de formación de memoria y su consolidación (Bekinschtein y cols., 2014). El hecho de que la MCH fue capaz de disminuir la expresión del receptor TrkB, podría indicar que dicho neuropéptido podría estar interfiriendo directa o indirectamente en estos procesos cognitivos. Lopez-Hill y cols. (2015) evidenciaron que el tratamiento con el antagonista de NMDARs MK-801 indujo una disminución de la presencia de BDNF en el hipocampo, lo cual se reflejó en un aumento de la latencia de transferencia en el modelo de LCEm. Esto no solo pone en evidencia un efecto amnésico del antagonista sino que también los receptores NMDA y el BDNF podrían actuar en conjunto en la formación de memorias (Goulart y cols., 2010; López y cols., 2017). Lu y cols. (2008) describieron al BDNF como el factor responsable de la consolidación y la memoria a largo plazo, rol que algunos autores han resaltado como alternativa terapéutica para patologías que afectan la memoria (Caffino y cols., 2020; Lu y cols., 2008; Schulze y cols., 2022). Es posible que una vez que la MCH se une a su receptor, el complejo formado por éstos

sea internalizado y degradado tras la detección de un aumento de la concentración extracelular de dicho neuropéptido como un proceso de desensibilización del circuito MCHérgico en el hipocampo (Chao y cols., 2006; Rajagopal & Shenoy, 2018). La dinámica de los receptores de MCH ha sido ampliamente estudiada por Saito y cols. (1999) en numerosos estudios donde han revelado detalles como regiones claves de la proteína del receptor (Chung y cols., 2009b; Hamamoto y cols., 2015; Saito y cols., 1999; Tetsuka y cols., 2004). Es importante destacar que los estudios realizados por el grupo de trabajo de Saito se han apoyado fuertemente en modelos no neuronales y cultivos celulares de HEK293 y células CHO, entre otros (Kobayashi y cols., 2021; Saito y cols., 1999). Si bien, estos estudios han aportado información clave para entender el funcionamiento del MCHR-1, los modelos utilizados no representan un sistema neuronal endógeno. En vista de esto, nuestro grupo de trabajo ha enfocado sus esfuerzos en entender cómo actúa dicho receptor en el SNC. Niño y cols. (2019) gracias a la aplicación de ensayos de inmunofluorescencia e inmunohistoquímica lograron localizar el MCHR-1 en las cilias primarias de neuronas presentes en el NDR. Los autores describen que el receptor se encontró localizado en las cilias primarias principalmente de neuronas GABAérgicas y serotoninérgicas y otras neuronas de perfil neuroquímico desconocido (esto fue previamente descrito por Devera y cols. (2015). En otros estudios, Ruiz-Viroga y cols. (2021), mediante el uso de R-MCH administrada por vía i.c.v., demostraron que la capacidad de internalización de la MCH se apreciaba en su mayoría a neuronas y no a células gliales (Ruiz-Viroga y cols., 2021). Aquellas neuronas que demostraron ser receptivas a la MCH se localizaron próximas a fibras MCHérgicas que inervan hipocampo, NSL, NAc y NDR (Ruiz-Viroga y cols., 2021). Considerando las observaciones mencionadas anteriormente, dado que entre la administración de MCH y la extracción de muestras para la detección de la expresión y presencia de las proteínas receptoras transcurrieron aproximadamente 24 horas, es posible que el complejo MCH/MCHR-1 haya sido internalizado y degradado en el interior celular. La disminución de la presencia del receptor TrkB podría explicarse si dicho receptor estuviera formando complejos de heterorreceptores junto con el MCHR-1. Al internalizarse este último, es posible que también TrkB sea internalizado por las neuronas y degradado en su interior (Yap & Winckler, 2015). Casarotto y cols. (2021) describieron a antidepressivos como la fluoxetina, imipramina y la ketamina como reguladores alostéricos de la actividad de TrkB capaces de activar la vía de BDNF y así generar efectos antidepressivos (Casarotto y cols., 2021). Considerando dicha observación, podría considerarse a la MCH como un modulador alostérico

capaz de inducir la internalización de TrkB tras su interacción (futuros estudios son requeridos para comprobar dicha hipótesis).

7.3. Tratamiento i.c.v. crónico con MCH

Los experimentos a discutir en el siguiente bloque, a diferencia del anterior, tuvieron como objetivo, por una parte, describir los efectos del tratamiento crónico i.c.v. de la MCH en condiciones basales y por otra parte los efectos en condiciones patológicas en el modelo de administración i.c.v. de estreptozotocina (STZ). Dicho modelo ha sido descrito en la bibliografía como capaz de reproducir características comportamentales y morfológicas similares a las exhibidas por pacientes diagnosticados con la enfermedad de Alzheimer (Grieb, 2016; Salkovic-Petrisic y cols., 2013).

Los modelos empleados para el estudio de la enfermedad de Alzheimer y otras patologías asociadas a dificultades cognitivas como la formación de nuevas memorias y su retención han sido desafiados en numerosas oportunidades frente a diversas pruebas de comportamiento y tratamientos farmacológicos (Knezovic y cols., 2015; Salkovic-Petrisic y cols., 2013). Particularmente, el modelo de STZ ha sido de gran uso para definir cuáles son los tipos de memoria que participan en el desempeño de animales de experimentación en pruebas comportamentales específicas y en qué condiciones se ven afectadas.

En la presente tesis de Doctorado, uno de los objetivos fue estudiar los efectos del tratamiento de STZ administrada a una dosis de 3 mg/Kg por vía i.c.v. 14 y 30 días luego de su administración en combinación con un modulador de memoria como es la MCH. El presente trabajo demostró que 30 días luego de tratados con STZ, los sujetos experimentales presentaron un déficit cognitivo reflejado en la incapacidad de discriminar entre el objeto novedoso y familiar. Dicho patrón fue descrito previamente por Knezovic y cols. (2015), los cuales describen una curva de deterioro cognitivo con dos fases marcadas: una fase aguda que se extiende hasta los 3 meses a partir de la administración de STZ, exhibiendo un rendimiento de máxima deficiencia en las pruebas comportamentales a los 30 días post-tratamiento; y una fase de deterioro crónico progresivo que se manifiesta a partir de los 90 días y donde comienzan a aparecer signos morfológicos y tisulares como la formación de placas de β -amiloide y proteína τ hiperfosforilada (Grünblatt y cols., 2007; Knezovic y cols., 2015). Oliveira

Santos y cols. (2012), evidenciaron las respuestas tisulares al tratamiento realizando ensayos de inmunomarcado para glía reactiva, marcadores de neurodegeneración y β -amiloide. Debido a estos cambios morfológicos presentados en el modelo de STZ, es común que los agentes terapéuticos utilizados para contrarrestar los efectos de este modelo apunten a combatir la inflamación y el estrés oxidativo que colabora con la progresión de la patología (Kamat, 2015; Kamat y cols., 2016). Muchos de las afecciones causadas por la administración i.c.v. de STZ fueron descritas como producto de defectos en el metabolismo de la glucosa en el SNC, apoyado por antecedentes previos del uso de STZ como una droga utilizada sistémicamente como modelo intervencionista para la diabetes de tipo I (Grünblatt y cols., 2007; Knezovic y cols., 2017; Lannert & Hoyer, 1998). Lannert y Hoyer (1998) demostraron que animales tratados con STZ i.c.v. presentaron dificultades para retener memorias obtenidas durante el entrenamiento para las pruebas de esquivas pasiva y *holeboard test* (Lannert & Hoyer, 1998). Los animales demostraron tiempos de latencia y desempeño post-entrenamiento similares al primer día de cada ensayo, permitiendo evidenciar dificultades en la adquisición de experiencia obtenida durante las sesiones de entrenamiento (Ekong y cols., 2022).

En el presente trabajo, aquellos animales que recibieron el tratamiento de STZ y fueron sometidos a la prueba NORT a los 14 y 30 días tuvieron tiempos de exploración similares para ambos objetos (novedoso y familiar), presentando valores de discriminación cercanos a 0, pudiendo evidenciar dificultades en la retención de memorias obtenidas durante el ensayo de muestra del NORT, 48 horas antes de la retención. Dichos resultados se condicen con observaciones realizadas en estudios previos donde ratones pre-tratados con 3 mg/Kg de STZ presentaron tiempos de exploración semejantes para el objeto familiar y novedoso a 14 y 21 días post-tratamiento (Ravelli y cols., 2017). Dicha dosis fue determinada por Mehla y cols. (2013) como la dosis mínima de STZ suficiente para exhibir déficits a nivel cognitivo apreciables en pruebas de comportamiento como el laberinto acuático de Morris, test de esquivas pasiva y LCEm. Dicha dosis fue posteriormente reafirmada por Rai y cols. (2014) como capaz de ejercer déficits cognitivos durante el laberinto acuático de Morris (Rai y cols., 2014). En este último estudio, esta dosis demostró ser suficiente para ejercer tanto un deterioro cognitivo como indicadores metabólicos y celulares de estrés oxidativo ejercido sobre estructuras moduladoras de la memoria a tan solo 15 días post-tratamiento con STZ (Rai y

cols., 2014). Estos descubrimientos no concuerdan con la descripción de la fase aguda descrita de Knezovic y cols. (2015) que tiene lugar a los 30 días de administrada la STZ (Knezovic y cols., 2015). Zappa-Villar y cols. (2018) demostraron que además de una reducción en la densidad de las ramificaciones de los astrocitos presentes en el hipocampo (específicamente en CA1 y CA3), el tratamiento de STZ fue capaz de generar tiempos de exploración similares para objeto novedoso y familiar en la prueba NORT y el laberinto de Barnes 25 días post-tratamiento (Zappa Villar y cols., 2018).

Es destacable observar que los animales tratados con vehículo para STZ y MCH por microbomba fueron capaces de discriminar el objeto novedoso del familiar siendo sometidos a la prueba NORT con intervalos de 48 horas. Si bien en los estudios de administración aguda intra-hipocampal y bilateral de MCH los animales no fueron capaces de discriminar el objeto novedoso del familiar, es importante remarcar que estos ensayos presentaron diferencias considerables en cuanto a los tiempos de los ensayos, e intervenciones aplicadas sobre los animales de experimentación. Como se mencionó anteriormente, existe una fase aguda visible a los 30 días iniciado el tratamiento con STZ en la que los animales muestran mayores deficiencias en su desempeño comportamental. Como se pudo observar en nuestros resultados, a los 14 días post-administración de STZ los animales presentaron una tendencia a la discriminación del objeto novedoso del familiar. Dicha discriminación no pudo observarse a los 30 días en los grupos controles, acorde a lo descrito por Knezovic y cols. (2015) para los estudios de esquivas inhibitorias (Knezovic y cols., 2015). Ravelli y cols. (2017) realizaron experimentos de administración de STZ a 3 mg/Kg en ratones y realizaron la prueba NORT a los 7, 14 y 21 días post-lesión (Ravelli y cols., 2017). Los autores describieron que hasta los 21 días post-administración de STZ, los grupos controles y pre-tratados con STZ no presentaron diferencias en los tiempos totales de exploración ni en los tiempos de exploración del objeto novedoso respecto al familiar. Es importante destacar que los experimentos realizados por Ravelli y cols. presentaron diferencias con los realizados en nuestro laboratorio para esta tesis de doctorado. En primer lugar, los sujetos de experimentación utilizados por Ravelli y cols. fueron ratones mientras que, en este caso, se utilizaron ratas adultas. La otra principal diferencia es el intervalo inter-ensayo aplicado: mientras que Ravelli y cols. utilizaron intervalos de 24 horas, en la presente tesis se utilizaron 48 horas. Estudios realizados por

nuestro equipo de investigación demostraron a que 15 y 30 días post-inyección de STZ, la discriminación entre el ON y el OF por parte de los animales no se ve afectada en la prueba de NORT (Cabral y cols. (2023), comunicación personal). Es importante indicar que el ITI empleado para estos ensayos es de 24 horas (también empleado por Ravelli y cols. (2017)). Actualmente existe escasa bibliografía disponible en la que se hayan empleado protocolos similares a los utilizados para esta tesis. A pesar de dichas diferencias, existe cierta tendencia en cuanto a las fluctuaciones presentes en el desempeño de los animales sometidos a la prueba NORT luego de recibir tratamientos con STZ por vía i.c.v. Por tal motivo, es posible describir cierto paralelismo entre los estudios en los que se utilizó dicha prueba y en los que el daño causado por el tratamiento de STZ fue evaluado en otras pruebas comportamentales como el test de esquivia inhibitoria. Particularmente a los 30 días post-tratamiento, es posible detectar diferencias entre los controles y los grupos tratados con STZ, en donde los controles fueron capaces de discriminar al objeto novedoso del familiar, mientras que los animales tratados con STZ no pudieron realizarlo.

Respecto a los grupos que recibieron MCH de forma crónica, detectamos que aquellos que recibieron vehículo de STZ y MCH crónica, presentaron dificultades para discriminar al objeto novedoso del familiar tanto a los 14 como a los 30 días de iniciada la administración de MCH. En contraste, los grupos pre-tratados con STZ y MCH crónica i.c.v. fueron capaces de distinguir el objeto novedoso del familiar tanto a los 14 como a los 30 días presentando diferencias significativas en los tiempos de exploración de ambos objetos y en la relación de discriminación. Antes de comenzar con la interpretación de estos resultados es importante recordar que, a diferencia de los grupos tratados con MCH aguda por vía intra-hipocampal, en los grupos de tratamiento crónico, la MCH fue administrada por vía intracerebroventricular durante 14 días a un flujo de 4 µg/día. Por lo tanto, la dosis empleada para este bloque de experimentos representa una variable importante que podría explicar la diferencia en los resultados obtenidos entre el tratamiento agudo y crónico.

Diversos estudios han evaluado los efectos de la MCH cuando es administrada de forma crónica por vía intra-cerebral. Estudios previos demostraron que inyecciones repetidas locales con distintos fármacos solían generar lesiones y aumento de muerte celular en regiones adyacentes a la punta de la cánula y sitio de inyección (Mangano & Schwarcz, 1983). En vista de esto y las dificultades de manipulación y estrés causado a los sujetos de

experimentación por las inyecciones repetidas, estudios posteriores utilizaron como herramientas de inyección las microbombas osmóticas. Esta estrategia garantiza tanto la estabilidad (tanto en dosis como en integridad estructural) del péptido a administrar como la liberación prolongada por un rango de tiempo específico reduciendo al mínimo los efectos no deseados sobre los sujetos de experimentación (Almohari, 2022; Bakhshi & North, 1995; Jain, 2020). Sabiendo que la MCH es un neuropéptido con conocidos efectos orexigénicos, muchos autores centraron sus estudios en los efectos de la administración crónica de dicho neuropéptido con el objetivo final de evaluar un posible antagonista de los MCHR-1 como fármaco anti-obesidad (Della-Zuana y cols., 2002; Gomori y cols., 2003). Della-Zuana y cols. (2002) argumenta que el aumento en la ingesta de alimento y peso corporal de las ratas se debe a la administración de MCH exógena sobre animales *knock-out* para este neuropéptido. Por tanto, estos resultados no pueden ser extrapolados a los efectos de la MCH administrada sobre un sistema endógeno para este neuropéptido alegando que dichos efectos pueden deberse a la ausencia del neuropéptido en el SNC (Della-Zuana y cols., 2002). Por otra parte, Gomori y cols. (2003) describen que al administrarla de forma crónica por vía i.c.v. en ratones se observó un aumento en la acumulación de tejido adiposo e hiperfagia que se mantuvo durante todo el tratamiento con MCH, a diferencia de otros estudios en los que el aumento de ingesta de alimento se observó solo hasta el día 5 de un total de 21 días de tratamiento (Gomori y cols., 2003; Ito y cols., 2003; Rossi y cols., 1997). En relación al control del peso corporal y la ingesta de alimento, observamos que aquellos animales tratados con MCH presentaron diferencias significativas en ambos aspectos respecto a los controles. La presencia del efecto del tratamiento crónico de MCH demuestra que la administración crónica de MCH ocurrió de manera correcta durante los 14 días de administración.

Si bien hay escasos estudios que evalúen el efecto de un tratamiento crónico con MCH sobre la memoria, existe numerosa evidencia bibliográfica que describe una relación entre algunos neuropéptidos y patologías que afectan particularmente a la memoria como es la enfermedad de Alzheimer. Muchos neuropéptidos han sido descritos como moduladores de la memoria y presentan efectos evidenciados a través de numerosas pruebas comportamentales (Borbély y cols., 2013). La MCH en particular ha sido puesta a prueba por Oh y cols. (2019) como un atenuante del deterioro cognitivo en modelos de Alzheimer donde se administró a ratones β -amiloide por vía intracerebral (Oh y cols., 2019). En este trabajo, la

MCH fue administrada de forma crónica por vía intranasal fue capaz de inducir la expresión de factores neurotróficos beneficiosos para la memoria, reducir los efectos neurotóxicos en el hipocampo provocados por la administración de β -amiloide, y la estimulación de fenómenos de LTP en el hipocampo (Oh y cols., 2019). Este estudio presenta evidencias contundentes de fenómenos inducidos por la MCH capaces de contrarrestar los defectos a nivel cognitivo presentes en modelos pre-clínicos de la enfermedad de Alzheimer. En otros estudios, la MCH y otros neuropéptidos han demostrado ser partícipes de la modulación de la memoria, por lo que podrían discutirse como factores capaces de intervenir en el progreso del deterioro cognitivo. Muchos síntomas que se presentan en la enfermedad de Alzheimer como trastornos del sueño y la depresión, se han asociado a disfunciones de núcleos hipotalámicos que son a su vez, centros de síntesis de neuropéptidos vinculados a dichas funciones (Dauvilliers, 2021; Liguori y cols., 2017, 2014). La MCH ha sido descrita en numerosas oportunidades como un modulador de las funciones descritas anteriormente (Lagos y cols., 2011a; Torterolo y cols., 2011; Urbanavicius y cols., 2014). Incluso Schmidt y cols. (2013) presentaron evidencia de una disminución en la concentración de MCH en el LCR de pacientes con EA, sugiriendo que el sistema MCHérgico se encuentra afectado en dicha patología (Schmidt y cols., 2013). Otros autores afirman que estos niveles bajos de MCH pueden ser consecuencia de una disminución en la expresión de los MCHR-1, lo cual lleva a una ausencia en la autorregulación de las neuronas MCHérgicas, estimulando su liberación para posteriormente ser inhibida por procesos de *feedback* negativo (Adamantidis y cols., 2005).

También se ha discutido ampliamente sobre la correlación existente entre trastornos del sueño y la EA. Se sabe actualmente que durante la fase de sueño REM el flujo de LCR a nivel encefálico colabora con la limpieza y remoción de β -amiloide y proteína τ -hiperfosforilada acumulada en el cerebro durante la vigilia y que dichos agregados proteicos en el tejido podrían interferir con la comunicación neuronal (Dauvilliers, 2021). También se ha descrito que existe una pérdida asociada a la edad de neuronas MCHérgicas y orexigénicas en el LHA que podría tener como consecuencia la desregulación del ciclo sueño-vigilia y trastornos de memoria (Kessler y cols., 2011).

Numerosos neuropéptidos no solo han sido descritos como partícipes en la modulación de la memoria y el aprendizaje, sino también como agentes neuroprotectores capaces de atenuar los distintos procesos patológicos de la EA (Chen y cols., 2019; Maletínská

y cols., 2019). Por ejemplo, la ghrelina es descrita en la bibliografía como un neuropéptido capaz de atenuar los defectos generados por la acumulación de placas de β -amiloide sobre la neurogénesis hipocampal, la disminución del LTP y, por lo tanto, también es capaz de reducir las afecciones a nivel cognitivo en ratones (Santos y cols., 2017). Por otro lado, el neuropéptido Y (NPY) ha sido reportado como capaz de combatir el estrés oxidativo generado por la acumulación de placas de β -amiloide en ratones así como también estimular la liberación de NGF y BDNF en ratones y en cultivo de neuronas corticales primarias, respectivamente (Croce y cols., 2013; dos Santos y cols., 2013).

Si bien hay pocos estudios sobre efectos neuroprotectores de la MCH, también ha sido reportada como una molécula con propiedades neuroprotectoras en otros modelos de patologías (Oh y cols., 2019; Park y cols., 2017). En un modelo de Parkinson inducido por administración crónica de MPTP, la MCH se administró a ratones por vía intranasal previo a la inyección de MPTP. Los autores observaron que dicho tratamiento fue capaz de mejorar tanto la memoria como la interacción social, ingesta de alimento y movimiento en los animales con signos característicos de la enfermedad de Parkinson. Estos efectos se revirtieron en animales que recibieron antagonistas para el receptor MCHR-1. No solo se observaron las mejoras mencionadas a nivel funcional sino también se evidenció en neuronas dopaminérgicas la activación de cascadas de señalización intracelular como la MAPK-ERK, entre otras vías asociadas a mecanismos de defensa contra diversas neurotoxinas. Este estudio pone en evidencia que la interacción de la MCH con su receptor, es capaz de activar mecanismos a nivel celular con un perfil neuroprotector para neuronas dopaminérgicas (Park y cols., 2017).

La participación de los neuropéptidos en la modulación de la memoria y otras funciones relacionadas a esta, abre puertas para considerar a la MCH como un factor influyente en dichos mecanismos protectores ante un caso de patología como la EA. Si no es por acción directa de la MCH, ya se ha descrito la asociación que existe entre dicho neuropéptido y la liberación de factores neurotróficos como el BDNF. Si bien, los resultados de la administración crónica de MCH por vía i.c.v. demostraron en nuestro caso generar un efecto amnésico en las ratas, el patrón observado en ratas pre-tratadas con STZ parecería favorecer la formación de memorias y su retención ya que los animales de estos grupos fueron capaces de discriminar de forma significativa el objeto novedoso del familiar, reflejándose en tiempos de exploración significativamente mayores para el objeto novedoso en comparación

con el familiar. Esta observación podría ser consecuencia de distintos frentes de acción de la MCH. Uno de los neuropéptidos reportados como agente neuroprotector fue el NPY. Las neuronas productoras de dicho neuropéptido se ubican en el núcleo arcuato (Arc), el cual proyecta fibras neuronales a numerosas estructuras entre las que se encuentra el LHA (Diniz y cols., 2017). Estas fibras fueron descritas por van del Pol (2004) como inhibitorias para las neuronas MCHérgicas y, por lo tanto, también capaz de inhibir la liberación de glutamato y GABA (Van Den Pol y cols., 2004). Se sabe que existe inervación recíproca entre el LHA y Arc. Esto fue evidenciado tras inyecciones de MCH en Arc, tras las cuales se observó un aumento en la ingesta de alimento (función regulada positivamente por el NPY) (Abbott y cols., 2003). Este vínculo funcional y estructural entre la MCH y NPY fue reportado previamente por Abbot y cols. (2003) y anteriormente por Tritos y cols. (1998) como un mecanismo de *feedback* negativo que impide una estimulación excesiva del sistema orexinérgico tras una liberación sin moderación de la MCH. En este caso, la activación de neuronas MCHérgicas, estimularía la liberación de NPY la cual podría regular la liberación de MCH. Considerando que en base a previos reportes se ha detectado una disminución de MCH en LCR de pacientes con Alzheimer y de su receptor a nivel del hipocampo, las observaciones realizadas sobre el poder de discriminación de los animales pre-tratados con STZ y MCH crónica podrían deberse a que el tratamiento crónico fue aplicado sobre un hipocampo con niveles deficientes de MCH, por lo que la administración exógena de MCH podría no solo estar actuando como repuesto para la MCH ya faltante sino también como un estimulante de la liberación de factores neurotróficos como el BDNF y otros neuropéptidos como el NPY (Calafate y cols., 2023). Sumado a estos agentes, es posible que la MCH también participe como un activador de cascadas de señalización que activen procesos de neuroprotección como los descritos por Oh y cols. (2019), fenómeno por el cual los daños causados por el tratamiento de STZ resulten atenuados e impida que se exhiban los patrones comportamentales observados en los grupos experimentales pre-tratados con STZ y vehículo de MCH (Oh y cols., 2019; Park y cols., 2017). Si bien se discute en la bibliografía sobre si la MCH es un agente con efectos amnésicos, los resultados obtenidos por nosotros para la prueba NORT apuntarían a que este neuropéptido, en una administración crónica, podría estar amortiguando los daños sobre la memoria que se estarían produciendo en el cerebro de los animales del modelo de EA basado en la administración de STZ i.c.v. Nuestros experimentos de administración local intra-hipocampal muestran que la MCH produce efectos amnésicos, lo cual resulta sumamente interesante.

Los grupos pre-tratados con MCH vía microbombas presentaron un patrón amnésico en relación al desempeño general del grupo experimental control. Este patrón se condice con resultados obtenidos con la administración aguda intra-hipocampal mostrados en la primera parte de la tesis, y en bibliografía en la que se presenta a la MCH como un factor favorable para los procesos de “olvido” que pueden darse por ejemplo durante el sueño REM (Izawa y cols., 2019). Si bien los sitios de inyección para el tratamiento agudo y crónico fueron distintos, y a pesar de que las distintas vías podrían influir sobre la integridad de la MCH camino a sus blancos celulares, los efectos observados en el NORT fueron similares tanto en el tratamiento agudo como en el crónico. Es importante también destacar que luego de finalizado el tratamiento crónico con MCH, y extraídas las microbombas, dichos animales mostraron un efecto similar tanto a los 14 días de tratamiento, como a los 30 días. Esto podría aportar evidencia preliminar de que el tratamiento crónico fue capaz de generar efectos a largo plazo en estructuras del SNC y en particular en el hipocampo. Se ha descrito que los fenómenos de neurogénesis se mantienen a nivel hipocampal en pacientes con EA pero no a niveles suficientes como para contrarrestar los estragos causados por dicha patología (Tobin y cols., 2019). También se ha reportado sobre la participación de ciertos neuropéptidos como el NPY sobre procesos de neurogénesis capaces de influir sobre la memoria y el aprendizaje así como otros procesos estimulantes de la liberación de BDNF en el hipocampo (Silva-Peña y cols., 2019; Zaben & Gray, 2013). Sabiendo los vínculos que existen entre el NPY y el BDNF, la MCH podría estar participando de forma directa o indirecta en la inducción de estos procesos. En base a otros estudios con administración crónica de MCH, entre otros fármacos, se destaca la ausencia de efectos no deseados que podrían generarse tras la administración del neuropéptido y posterior distribución a otras estructuras del encéfalo tras su transporte por el flujo de LCR. Es importante mencionar tal detalle dado que, en estudios anteriores de nuestro equipo de trabajo, se pudo evidenciar mediante el uso de MCH conjugada al fluorocromo rodamina, que los fármacos administrados por vía i.c.v. son capaces de distribuirse ampliamente y de manera difusa por numerosas estructuras del encéfalo (Devera y cols., 2015; Ruiz-Viroga y cols., 2021). Sumado a esto, se sabe que la eficacia de difusión de dicha droga disminuye con la distancia entre el sitio de inyección y estructuras de interés para el tratamiento farmacológico (Banks, 2011; Fenstermacher & Kaye, 1988; Syková & Nicholson, 2008). Por tal motivo, es válido inferir que la concentración de MCH capaz de alcanzar y ser asimilada por el hipocampo no sea suficiente para saturar el sistema MCHérgico que inerva

tal estructura, provocando su desensibilización (Bulat & Klarica, 2011). Se puede agregar que además hay que contar con variables como el flujo de LCR diario a nivel ventricular, su tasa de producción, etc. (Bulat & Klarica, 2011; Proescholdt y cols., 1999). Por lo tanto, es probable que la MCH administrada de forma crónica i.c.v., además de alcanzar sus sitios blancos, también es removida por el sistema y posteriormente degradada.

En suma, estos resultados en conjunto permiten concluir que la administración crónica de MCH es capaz de reducir los daños causados por el tratamiento con STZ, reflejado en efectos pro-cognitivos cuando la MCH se aplica en condiciones patológicas, mientras que en condiciones fisiológicas presenta un efecto amnésico. Futuros estudios se requieren para determinar a través de cuales vías la MCH podría estar no solo colaborando con contrarrestar los efectos tóxicos de la STZ, sino también induciendo efectos mantenidos a largo plazo incluso una vez finalizado el tratamiento crónico.

8. CONCLUSIONES

Basado en los resultados descritos en la presente Tesis de Doctorado, podemos concluir que:

- *El tratamiento intra-hipocampal agudo con MCH en ratas, presenta un efecto dosis-dependiente sobre el desempeño de los animales en las pruebas NORT y LCEm.*
- *El tratamiento intra-hipocampal agudo con 25 ng de MCH en ratas demostró ejercer un efecto beneficioso sobre la discriminación del objeto novedoso y familiar de parte de las ratas, sugiriendo un posible efecto pro-cognitivo de dicho tratamiento.*
- *De las cantidades de MCH empleadas en este trabajo, cuando se administra a 200 y 500 ng, los efectos de dicho neuropéptido son de carácter pro-amnésico, dificultando el desempeño de los animales en ambas pruebas de comportamiento (NORT y LCEm).*
- *Los efectos amnésicos observados para cantidades altas son bloqueados cuando los animales son pre-tratados con un antagonista del MCHR-1, lo cual sugiere que dichos efectos son dependientes de la interacción entre MCH y su receptor.*
- *Los efectos pro-amnésicos observados podrían deberse, no a una disminución en la expresión de genes asociados a receptores glutamatérgicos sino a una disminución en la expresión hipocampal del receptor TrkB, indicando una posible influencia de la MCH sobre los mecanismos de modulación cognitiva del factor neurotrófico BDNF.*
- *El tratamiento crónico con MCH por vía i.c.v. fue capaz de inducir efectos pro-amnésicos al igual que para el tratamiento agudo.*
- *El tratamiento crónico de MCH sobre animales pre-tratados con STZ demostró una mejora en el desempeño de los animales en la prueba NORT.*

9. PERSPECTIVAS

- Sabiendo que la formación de memorias es un proceso complejo y prolongado en el tiempo, la administración de MCH en distintas etapas de dicho proceso podría brindar más respuestas sobre la participación de este neuropéptido en dicha función cognitiva.
- En vista de lo observado para el grupo experimental tratado con 25 ng de MCH, estudiar la expresión de los genes y proteínas asociadas a procesos formación de la memoria podría poner en evidencia si efectivamente dicho tratamiento es capaz de favorecer un efecto pro-cognitivo, reforzando la teoría de que los efectos de la MCH sobre la memoria son dependientes de la dosis administrada.
- Respecto al tratamiento crónico con MCH, estudiar los efectos de éste sobre el modelo de administración de STZ empleando tiempos mayores post-STZ con el fin de observar sus efectos a nivel tisular y celular. Esto también permitiría evaluar posibles efectos duraderos del tratamiento con MCH crónica.
- Estudiar los efectos de la MCH crónica sobre la expresión génica y niveles proteicos de moléculas clave para la formación de memorias a nivel del hipocampo, como el BDNF y su receptor TrkB, entre otros.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbott, C.R., Kennedy, A.R., Wren, A.M., Rossi, M., Murphy, K.G., Seal, L.J., Todd, J.F., Ghatei, M.A., Small, C.J., Bloom, S.R., 2003. Identification of hypothalamic nuclei involved in the orexigenic effect of melanin-concentrating hormone. *Endocrinology* 144, 3943–3949. <https://doi.org/10.1210/en.2003-0149>
- Abounoori, M., Maddah, M.M., Ardeshiri, M.R., 2022. Orexin neuropeptides modulate the hippocampal-dependent memory through basolateral amygdala interconnections. *Cereb. Circ. - Cogn. Behav.* 3, 100035. <https://doi.org/10.1016/j.cccb.2021.100035>
- Adamantidis, A., de Lecea, L., 2009. A role for Melanin-Concentrating Hormone in learning and memory. *Peptides* 30, 2066–2070.
- Adamantidis, A., Thomas, E., Foidart, A., Tyhon, A., Coumans, B., Minet, A., Tirelli, E., Seutin, V., Grisar, T., Lakaye, B., 2005. Disrupting the melanin-concentrating hormone receptor 1 in mice leads to cognitive deficits and alterations of NMDA receptor function. *Eur. J. Neurosci.* 21, 2837–2844. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04100.x>
- Adami, P.V.M., Quijano, C., Magnani, N., Galeano, P., Evelson, P., Cassina, A., Do Carmo, S., Leal, M.C., Castaño, E.M., Cuello, A.C., Morelli, L., 2017. Synaptosomal bioenergetic defects are associated with cognitive impairment in a transgenic rat model of early Alzheimer's disease. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 37, 69–84. <https://doi.org/10.1177/0271678X15615132>
- Albini, M., Krawczun-Rygmaczewska, A., Cesca, F., 2023. Astrocytes and brain-derived neurotrophic factor (BDNF). *Neurosci. Res.* 197, 42–51. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2023.02.001>
- Almohari, Y., 2022. Osmotic Pump Drug Delivery Systems—A Comprehensive Review. *Pharmaceuticals* 15. <https://doi.org/10.3390/ph15111430>
- Antunes, M., Biala, G., 2012. The novel object recognition memory: Neurobiology, test procedure, and its modifications. *Cogn. Process.* 13, 93–110. <https://doi.org/10.1007/s10339-011-0430-z>
- Argyrousi, E.K., Heckman, P.R.A., Prickaerts, J., 2018. Glutamate Signalling in Object Novelty

- Recognition Memory Tests. *Handb. Behav. Neurosci.* 27, 541–551.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812012-5.00035-5>
- Bakhshi, S., North, R.B., 1995. Implantable pumps for drug delivery to the brain. *J. Neurooncol.* 26, 133–139. <https://doi.org/10.1007/BF01060219>
- Balderas, I., Rodriguez-ortiz, C.J., Bermudez-rattoni, F., 2015. Consolidation and reconsolidation of object recognition memory. *Behav. Brain Res.* 285, 213–222.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.08.049>
- Banks, W. a, 2011. Drug delivery to the brain. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 713–731.
<https://doi.org/10.1016/j.addr.2011.12.005>
- Barker, G.R.I., Warburton, E.C., 2015. Object-in-place associative recognition memory depends on glutamate receptor neurotransmission within two defined hippocampal-cortical circuits: A critical role for AMPA and NMDA receptors in the hippocampus, perirhinal, and prefrontal cortices. *Cereb. Cortex* 25, 472–481.
<https://doi.org/10.1093/cercor/bht245>
- Barkus, C., Mchugh, S.B., Sprengel, R., Seeburg, P.H., Rawlins, J.N.P., Bannerman, D.M., 2010. Hippocampal NMDA receptors and anxiety : At the interface between cognition and emotion. *Eur. J. Pharmacol.* 626, 49–56. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2009.10.014>
- Barnes, J.R., Mukherjee, B., Rogers, B.C., Nafar, F., Gosse, M., Parsons, M.P., 2020. The relationship between glutamate dynamics and activity-dependent synaptic plasticity. *J. Neurosci.* 40, 2793–2807. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1655-19.2020>
- Beck, B., Pourié, G., 2013. Ghrelin, neuropeptide Y, and other feeding-regulatory peptides active in the Hippocampus: Role in learning and memory. *Nutr. Rev.* 71, 541–561.
<https://doi.org/10.1111/nure.12045>
- Beekly, B.G., Rupp, A., Burgess, C.R., Elias, C.F., 2023. Fast neurotransmitter identity of MCH neurons: Do contents depend on context? *Front. Neuroendocrinol.* 70, 101069.
<https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2023.101069>
- Bekinschtein, P., Cammarota, M., Medina, J.H., 2014. BDNF and memory processing. *Neuropharmacology* 76, 677–683. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.04.024>

- Bevins, R.A., Besheer, J., 2006. Object recognition in rats and mice: A one-trial non-matching-to-sample learning task to study "recognition memory." *Nat. Protoc.* 1, 1306–1311.
<https://doi.org/10.1038/nprot.2006.205>
- Bird, C.M., 2017. The role of the hippocampus in recognition memory. *Cortex* 93, 155–165.
<https://doi.org/10.1016/j.cortex.2017.05.016>
- Bird, C.M., Burgess, N., 2008. The hippocampus and memory: Insights from spatial processing. *Nat. Rev. Neurosci.* 9, 182–194. <https://doi.org/10.1038/nrn2335>
- Bittencourt, J.C., Presse, F., Arias, C., Peto, C., Vaughan, J., Nahon, J., Vale, W., Sawchenko, P.E., 1992. The Melanin-Concentrating Hormone System of the Rat Brain : An Immuno- and Hybridization Histochemical Characterization. *J. Comp. Neurol.* 319, 218–245.
- Blanco, E., Galeano, P., Holubiec, M.I., Romero, J.I., Logica, T., Rivera, P., Pavón, F.J., Suarez, J., Capani, F., de Fonseca, F.R., 2015. Perinatal asphyxia results in altered expression of the hippocampal acylethanolamide/endocannabinoid signaling system associated to memory impairments in postweaned rats. *Front. Neuroanat.* 9, 1–16.
<https://doi.org/10.3389/fnana.2015.00141>
- Bliss, T.V., Collingridge, G., 1993. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361, 31–39.
- Borbély, É., Scheich, B., Helyes, Z., 2013. Neuropeptides in learning and memory. *Neuropeptides* 47, 439–450. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2013.10.012>
- Brockmeier, J., 2010. After the archive: Remapping memory. *Cult. Psychol.* 16, 5–35.
<https://doi.org/10.1177/1354067X09353212>
- Brolin, E., Zellerroth, S., Jonsson, A., Hallberg, M., Grönbladh, A., Nyberg, F., 2018. Chronic administration of morphine using mini-osmotic pumps affects spatial memory in the male rat. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 167, 1–8.
<https://doi.org/10.1016/j.pbb.2018.01.007>
- Brouwer, I., Lenstra, T.L., 2019. Visualizing transcription: key to understanding gene expression dynamics. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 51, 122–129.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2019.05.031>

- Bulat, M., Klarica, M., 2011. Recent insights into a new hydrodynamics of the cerebrospinal fluid. *Brain Res. Rev.* 65, 99–112. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2010.08.002>
- Caffino, L., Mottarlini, F., Fumagalli, F., 2020. Born to Protect : Leveraging BDNF Against Cognitive Deficit in Alzheimer ' s Disease. *CNS Drugs.* <https://doi.org/10.1007/s40263-020-00705-9>
- Cahill, L., McGaugh, J.L., 1998. Mechanisms of emotional arousal and lasting declarative memory. *Trends Neurosci.* 21, 294–299. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(97\)01214-9](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(97)01214-9)
- Calafate, S., Özturan, G., Thrupp, N., Vanderlinden, J., Santa-Marinha, L., Morais-Ribeiro, R., Ruggiero, A., Bozic, I., Rusterholz, T., Lorente-Echeverría, B., Dias, M., Chen, W.T., Fiers, M., Lu, A., Vlaeminck, I., Creemers, E., Craessaerts, K., Vandenbempt, J., van Boekholdt, L., Poovathingal, S., Davie, K., Thal, D.R., Wierda, K., Oliveira, T.G., Slutsky, I., Adamantidis, A., De Strooper, B., de Wit, J., 2023. Early alterations in the MCH system link aberrant neuronal activity and sleep disturbances in a mouse model of Alzheimer's disease, *Nature Neuroscience.* Springer US. <https://doi.org/10.1038/s41593-023-01325-4>
- Cammarota, M., Levi De Stein, M., Paratcha, G., Bevilaqua, L.R.M., Izquierdo, I., Medina, J.H., 2000. Rapid and transient learning-associated increase in NMDA NR1 subunit in the rat hippocampus. *Neurochem. Res.* 25, 567–572. <https://doi.org/10.1023/A:1007590415556>
- Carrillo-Reid, L., 2022. Neuronal ensembles in memory processes. *Semin. Cell Dev. Biol.* 125, 136–143. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2021.04.004>
- Casarotto, P.C., Girysh, M., Fred, S.M., Kovaleva, V., Moliner, R., Enkavi, G., Biojone, C., Cannarozzo, C., Sahu, M.P., Kaurinkoski, K., Brunello, C.A., Steinzeig, A., Winkel, F., Patil, S., Vestring, S., Serchov, T., Diniz, C.R.A.F., Laukkanen, L., Cardon, I., Antila, H., Rog, T., Piepponen, T.P., Bramham, C.R., Normann, C., Lauri, S.E., Saarma, M., Vattulainen, I., Castrén, E., 2021. Antidepressant drugs act by directly binding to TRKB neurotrophin receptors. *Cell* 184, 1299-1313.e19. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.01.034>
- Chaki, S., Funakoshi, T., Hirota-okuno, S., Nishiguchi, M., Shimazaki, T., Iijima, M., Grottick,

- A.J., Kanuma, K., Omodera, K., Sekiguchi, Y., Okuyama, S., Tran, T., Semple, G., Thomsen, W., 2005a. Anxiolytic- and Antidepressant-Like Profile of ATC0065 and ATC0175 : Nonpeptidic and Orally Active Melanin- Concentrating Hormone Receptor 1 Antagonists 313, 831–839. <https://doi.org/10.1124/jpet.104.081711>. Several
- Chaki, S., Yamaguchi, J., Yamada, H., Thomsen, W., Tran, T.-A., Semple, G., Sekiguchi, Y., 2005b. ATC0175: an orally active melanin-concentrating hormone receptor 1 antagonist for the potential treatment of depression and anxiety. *CNS Drug Rev.* 11, 341–352.
- Chao, M.Y., Rajagopal, R., Lee, F.S., 2006. Neurotrophin signalling in health and disease. *Clin. Sci.* 110, 167–173. <https://doi.org/10.1042/CS20050163>
- Chao, O.Y., de Souza Silva, M.A., Yang, Y.M., Huston, J.P., 2020. The medial prefrontal cortex - hippocampus circuit that integrates information of object, place and time to construct episodic memory in rodents: Behavioral, anatomical and neurochemical properties. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 113, 373–407. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2020.04.007>
- Chao, O.Y., Huston, J.P., de Souza Silva, M.A., 2018. The Hippocampal-Cortical Networks Subservicing Episodic Memory and Its Component Memory Systems for Object, Place and Temporal Order, *Handbook of Behavioral Neuroscience*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812012-5.00014-8>
- Chee, M.J.S., Pissios, P., Maratos-Flier, E., 2013. Neurochemical characterization of neurons expressing melanin-concentrating hormone receptor 1 in the mouse hypothalamus. *J. Comp. Neurol.* 521, 2208–2234. <https://doi.org/10.1002/cne.23273>
- Chen, X.Y., Du, Y.F., Chen, L., 2019. Neuropeptides exert neuroprotective effects in alzheimer’s disease. *Front. Mol. Neurosci.* 11. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00493>
- Chibnik, L.B., Wolters, F.J., Bäckman, K., Beiser, A., Berr, C., Bis, J.C., Boerwinkle, E., Bos, D., Brayne, C., Dartigues, J.F., Darweesh, S.K.L., Debette, S., Davis-Plourde, K.L., Dufouil, C., Fornage, M., Grasset, L., Gudnason, V., Hadjichrysanthou, C., Helmer, C., Ikram, M.A., Ikram, M.K., Kern, S., Kuller, L.H., Launer, L., Lopez, O.L., Matthews, F., Meirelles, O., Mosley, T., Ower, A., Psaty, B.M., Satizabal, C.L., Seshadri, S., Skoog, I., Stephan, B.C.M.,

- Tzourio, C., Waziry, R., Wong, M.M., Zettergren, A., Hofman, A., 2017. Trends in the incidence of dementia: design and methods in the Alzheimer Cohorts Consortium. *Eur. J. Epidemiol.* 32, 931–938. <https://doi.org/10.1007/s10654-017-0320-5>
- Chronister, R.B., White Jr., L.E., 1975. Fiberarchitecture of the hippocampal formation: Anatomy, projections, and structural significance, in: *The Hippocampus*. pp. 9–39.
- Chung, S., Parks, G.S., Lee, C., Civelli, O., 2011. Recent updates on the melanin-concentrating hormone (MCH) and its receptor system: lessons from MCH1R antagonists. *J. Mol. Neurosci.* 43, 115–121. <https://doi.org/10.1007/s12031-010-9411-4>
- Chung, S., Saito, Y., Civelli, O., 2009a. MCH receptors/gene structure-in vivo expression. *Peptides* 30, 1985–1989. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2009.07.017>
- Chung, S., Saito, Y., Civelli, O., 2009b. MCH receptors/gene structure-in vivo expression. *Peptides* 30, 1985–1989. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2009.07.017>
- Cohen, S.J., Munchow, A.H., Rios, L.M., Zhang, G., Ásgeirsdóttir, H.N., Stackman, R.W., 2013. The rodent hippocampus is essential for nonspatial object memory. *Curr. Biol.* 23, 1685–1690. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.07.002>
- Cohen, S.J., Stackman, R.W., 2015. Assessing rodent hippocampal involvement in the novel object recognition task. A review. *Behav. Brain Res.* 285, 105–117. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.08.002>
- Concetti, C., Bracey, E.F., Peleg-Raibstein, D., Burdakov, D., 2020. Control of fear extinction by hypothalamic melanin-concentrating hormone-expressing neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 117, 22514–22521. <https://doi.org/10.1073/pnas.2007993117>
- Concetti, C., Peleg-Raibstein, D., Burdakov, D., 2024. Hypothalamic MCH Neurons: From Feeding to Cognitive Control. *Function* 5, 1–15. <https://doi.org/10.1093/function/zqad059>
- Croce, N., Gelfo, F., Ciotti, M.T., Federici, G., Caltagirone, C., Bernardini, S., Angelucci, F., 2013. NPY modulates miR-30a-5p and BDNF in opposite direction in an in vitro model of Alzheimer disease: A possible role in neuroprotection? *Mol. Cell. Biochem.* 376, 189–195. <https://doi.org/10.1007/s11010-013-1567-0>

- Dauvilliers, Y., 2021. Hypocretin/Orexin, Sleep and Alzheimer's Disease. *Front. Neurol. Neurosci.* 45, 139–149. <https://doi.org/10.1159/000514967>
- De Jong, T. V., Moshkin, Y.M., Guryev, V., 2019. Gene expression variability: The other dimension in transcriptome analysis. *Physiol. Genomics* 51, 145–158. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00128.2018>
- Del Cid-Pellitero, E., Jones, B.E., 2012. Immunohistochemical evidence for synaptic release of GABA from melanin-concentrating hormone containing varicosities in the locus coeruleus. *Neuroscience* 223, 269–76. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.07.072>
- Della-Zuana, O., Presse, F., Ortola, C., Nahon, J.L., Levens, N., 2002. Acute and chronic administration of melanin-concentrating hormone enhances food intake and body weight in Wistar and Sprague-Dawley rats. *Int. J. Obes.* 26, 1289–1295. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0802079>
- Devera, A., Pascovich, C., Lagos, P., Falconi, A., Sampogna, S., Chase, M.H., Torterolo, P., 2015. Melanin-concentrating hormone (MCH) modulates the activity of dorsal raphe neurons. *Brain Res.* 1598, 114–128. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.12.032>
- Diniz, G.B., Battagello, D.S., Cherubini, P.M., Cesar, J.D.R., Klein, L.M.O., Motta-teixeira, L.C., Miranda-anaya, L.V.S.M., Morales, T., Bittencourt, J.C., 2019. Melanin-concentrating hormone peptidergic system : Comparative morphology between muroid species 1–29. <https://doi.org/10.1002/cne.24723>
- Diniz, G.B., Battagello, D.S., Klein, M.O., Bono, B.S.M., Ferreira, J.G.P., Motta-Teixeira, L.C., Duarte, J.C.G., Presse, F., Nahon, J.L., Adamantidis, A., Chee, M.J., Sita, L. V., Bittencourt, J.C., 2020. Ciliary melanin-concentrating hormone receptor 1 (MCHR1) is widely distributed in the murine CNS in a sex-independent manner. *J. Neurosci. Res.* 98, 2045–2071. <https://doi.org/10.1002/jnr.24651>
- Diniz, G.B., Bittencourt, J.C., Hahn, J.D., Kanoski, S.E., Barson, J.R., Bittencourt, J.C., 2017. The Melanin-Concentrating Hormone as an Integrative Peptide Driving Motivated Behaviors. *Front. Syst. Neurosci.* 11, 1–26. <https://doi.org/10.3389/fnsys.2017.00032>
- dos Santos, V. V., Santos, D.B., Lach, G., Rodrigues, A.L.S., Farina, M., De Lima, T.C.M.,

- Prediger, R.D., 2013. Neuropeptide Y (NPY) prevents depressive-like behavior, Spatial memory deficits and oxidative stress following amyloid- β (A β 1-40) administration in mice. *Behav. Brain Res.* 244, 107–115. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.01.039>
- Ekong, M.B., Odinukaeze, F.N., Nwonu, A.C., Mbadugha, C.C., Nwakanma, A.A., 2022. Brain activities of streptozotocin-induced diabetic Wistar rats treated with gliclazide: Behavioural, biochemical and histomorphology studies. *IBRO Neurosci. Reports* 12, 271–279. <https://doi.org/10.1016/j.ibneur.2022.04.001>
- Ennaceur, A., 2010. One-trial object recognition in rats and mice: Methodological and theoretical issues. *Behav. Brain Res.* 215, 244–254. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.12.036>
- Ennaceur, A., Delacour, J., 1988. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. I: Behavioral data. *Behav. Brain Res.* 31, 47–59. [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(05\)80315-8](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(05)80315-8)
- Ennaceur, A., Michalikova, S., Bradford, A., Ahmed, S., 2005. Detailed analysis of the behavior of Lister and Wistar rats in anxiety, object recognition and object location tasks. *Behav. Brain Res.* 159, 247–266. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2004.11.006>
- Estanislau, C., Ramos, A.C., Ferraresi, P.D., Costa, N.F., de Carvalho, H.M.C.P., Batistela, S., 2011. Individual differences in the elevated plus-maze and the forced swim test. *Behav. Processes* 86, 46–51. <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2010.08.008>
- Fenstermacher, J., Kaye, T., 1988. Drug “ Diffusion” within the Brain. *Ann. New York Acad. Sci.* 29–39.
- França, T.F.A., Monserrat, J.M., 2018. How the Hippocampus Represents Memories: Making Sense of Memory Allocation Studies. *BioEssays* 40, 1–10. <https://doi.org/10.1002/bies.201800068>
- Galeano, P., Blanco, E., Logica Tornatore, T.M.A., Romero, J.I., Holubiec, M.I., Rodríguez De Fonseca, F., Capani, F., 2015. Life-long environmental enrichment counteracts spatial learning, reference and working memory deficits in middle-aged rats subjected to Perinatal asphyxia. *Front. Behav. Neurosci.* 8, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2014.00406>

- Gao, X.-B., 2009. Electrophysiological effects of MCH on neurons in the hypothalamus. *Peptides* 30, 2025–2030. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2009.05.006>
- Gao, X., 2009. Electrophysiological Effects Of MCH On Neurons In The Hypothalamus. *Peptides* 30, 2025–2030. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2009.05.006>.Electrophysiological
- Gao, X., Pol, A.N. Van Den, 2002. Melanin concentrating hormone depresses L,N and P / Q-type voltage-dependent calcium channels in rat lateral hypothalamic neurons. *J. Physiol.* 542, 273–286.
- Gao, X., Pol, A.N. Van Den, 2001. Melanin concentrating hormone depresses synaptic activity of glutamate and GABA neurons from rat lateral hypothalamus. *J. Physiol.* 533, 237–252.
- Gao, X.B., 2018. The role of melanin-concentrating hormone in the regulation of the sleep/wake cycle: Sleep promoter or arousal modulator? *Melanin-Concentrating Horm. Sleep Mol. Funct. Clin. Asp.* 57–74. https://doi.org/10.1007/978-3-319-75765-0_3
- Glick, M., Segal-Lieberman, G., Cohen, R., Kronfeld-Schor, N., 2009. Chronic MCH infusion causes a decrease in energy expenditure and body temperature, and an increase in serum IGF-1 levels in mice. *Endocrine* 36, 479–485. <https://doi.org/10.1007/s12020-009-9252-5>
- Gomori, A., Ishihara, A., Ito, Masahiko, Mashiko, S., Matsushita, H., Yumoto, M., Ito, Makoto, Tanaka, T., Tokita, S., Moriya, M., Iwaasa, H., Kanatani, A., 2003. Chronic intracerebroventricular infusion of MCH causes obesity in mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 284, E583-8. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00350.2002>
- Goulart, B.K., de Lima, M.N.M., de Farias, C.B., Reolon, G.K., Almeida, V.R., Quevedo, J., Kapczinski, F., Schröder, N., Roesler, R., 2010. Ketamine impairs recognition memory consolidation and prevents learning-induced increase in hippocampal brain-derived neurotrophic factor levels. *Neuroscience* 167, 969–973. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.03.032>
- Grieb, P., 2016. Intracerebroventricular Streptozotocin Injections as a Model of Alzheimer’s Disease: in Search of a Relevant Mechanism. *Mol. Neurobiol.* 53, 1741–1752.

<https://doi.org/10.1007/s12035-015-9132-3>

Grosmark, A., Mizuseki, K., Pastalkova, E., Diba, K., Buzsaki, G., 2012. REM sleep reorganizes hippocampal excitability. *Neuron* 75, 1001–1007.

<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.08.015>.REM

Grünblatt, E., Salkovic-Petrisic, M., Osmanovic, J., Riederer, P., Hoyer, S., 2007. Brain insulin system dysfunction in streptozotocin intracerebroventricularly treated rats generates hyperphosphorylated tau protein. *J. Neurochem.* 101, 757–770.

<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.04368.x>

Hamamoto, A., Kobayashi, Y., Saito, Y., 2015. Identification of amino acids that are selectively involved in Gi/o activation by rat melanin-concentrating hormone receptor 1. *Cell. Signal.* 27, 818–827. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2015.01.008>

Harris, J.J., Burdakov, D., 2024. A role for MCH neuron firing in modulating hippocampal plasticity threshold. *Peptides* 172, 171128.

<https://doi.org/10.1016/j.peptides.2023.171128>

Hawes, B.E., Kil, E., Green, B., Neill, K.I.M.O., Fried, S., Graziano, M.P., 2000. The Melanin-Concentrating Hormone Receptor Couples to Multiple G Proteins to Activate Diverse Intracellular Signaling Pathways. *Endocrinology* 141, 4524–4532.

Hempstead, B.L., 2015. Brain-Derived Neurotrophic Factor: Three Ligands, Many Actions. *Trans. Am. Clin. Climatol. Assoc.* 126, 9–19.

Hervieu, G.J., Cluderay, J.E., Harrison, D., Meakin, J., Maycox, P., Nasir, S., Leslie, R.A., 2000. The distribution of the mRNA and protein products of the melanin-concentrating hormone (MCH) receptor gene , slc-1 , in the central nervous system of the rat. *Eur. J. Neurosci.* 12, 1194–1216.

Hill, X.L., Richeri, A., Scorza, C., 2015. Measure of anxiety-related behaviors and hippocampal BDNF levels associated to the amnesic effect induced by MK-801 evaluated in the modified elevated plus-maze in rats. *Physiol. Behav.* 147, 359–363.

<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2015.05.013>

Hliák, Z., Krejčí, I., 2002. MK-801 induced amnesia for the elevated plus-maze in mice. *Behav.*

- Brain Res. 131, 221–225. [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(01\)00347-3](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(01)00347-3)
- Holubiec, M.I., Romero, J.I., Suárez, J., Portavella, M., Fernández-espejo, E., Blanco, E., Galeano, P., Fonseca, F.R. De, 2018. Palmitoylethanolamide prevents neuroinflammation , reduces astrogliosis and preserves recognition and spatial memory following induction of neonatal anoxia-ischemia. *Psychopharmacology (Berl)*. 235, 2929–2945.
- Hoyer, S., Muller, D., Plaschke, K., 1994. Desensitization of brain insulin receptor. Effect on glucose/energy and related metabolism. *J. Neural Transm. Suppl.* 259–268. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-9350-1_20
- Hua, R., Yu, S., Liu, M., Li, H., 2018. A PCR-based method for RNA probes and applications in neuroscience. *Front. Neurosci.* 12, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00266>
- Ito, Masahiko, Gomori, A., Ishihara, A., Oda, Z., Mashiko, S., Matsushita, H., Yumoto, M., Ito, Makoto, Sano, H., Tokita, S., Moriya, M., Iwaasa, H., Kanatani, A., 2003. Characterization of MCH-mediated obesity in mice. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* 284, E940–E945. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00529.2002>
- Itoh, J., Nabeshima, T., Kameyama, T., 1991. Utility of an elevated plus-maze for dissociation of amnesic and behavioral effects of drugs in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 194, 71–76. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(91\)90125-A](https://doi.org/10.1016/0014-2999(91)90125-A)
- Itoh, J., Nabeshima, T., Kameyama, T., 1990. Utility of an elevated plus-maze for the evaluation of memory in mice : effects of nootropics , scopolamine and electroconvulsive shock. *Psychol. Bull.* 101, 27–33.
- Iwamura, E., Yamada, K., Ichitani, Y., 2016. Involvement of hippocampal NMDA receptors in retrieval of spontaneous object recognition memory in rats. *Behav. Brain Res.* 307, 92–99. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2016.03.048>
- Izawa, S., Chowdhury, S., Miyazaki, T., Mukai, Y., Ono, D., Inoue, R., Ohmura, Y., Mizoguchi, H., Kimura, K., Yoshioka, M., Terao, A., Kilduff, T.S., Yamanaka, A., 2019. REM sleep-active MCH neurons are involved in forgetting hippocampusdependent memories. *Science (80-.)*. 365, 1308–1313. <https://doi.org/10.1126/science.aax9238>

- Jain, K.K., 2020. An Overview of Drug Delivery Systems, *Methods in Molecular Biology*.
https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9798-5_1
- Johansson, A., 2016. Evolution of physicochemical properties of melanin concentrating hormone receptor 1 (MCHR1) antagonists. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 26, 4559–4564.
<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.08.072>
- Joshi, V. V., Patel, N.D., Rehan, M.A., Kuppa, A., 2019. Mysterious Mechanisms of Memory Formation: Are the Answers Hidden in Synapses? *Cureus* 11.
<https://doi.org/10.7759/cureus.5795>
- Kaar, A., Weir, M.P., Rae, M.G., 2024. Altered neuronal group 1 metabotropic glutamate receptor- and endoplasmic reticulum-mediated Ca²⁺ signaling in two rodent models of Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* 823.
- Kamat, P.K., 2015. Streptozotocin induced Alzheimer's disease like changes and the underlying neural degeneration and regeneration mechanism. *Neural Regen. Res.* 10, 1050–1052. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.160076>
- Kamat, P.K., Kalani, A., Rai, S., Tota, S.K., Kumar, A., Ahmad, A.S., 2016. Streptozotocin Intracerebroventricular-Induced Neurotoxicity and Brain Insulin Resistance: a Therapeutic Intervention for Treatment of Sporadic Alzheimer's Disease (sAD)-Like Pathology. *Mol. Neurobiol.* 53, 4548–4562. <https://doi.org/10.1007/s12035-015-9384-y>
- Kanoski, S.E., Grill, H.J., 2017. Hippocampus Contributions to Food Intake Control: Mnemonic, Neuroanatomical, and Endocrine Mechanisms. *Biol. Psychiatry* 81, 748–756.
<https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2015.09.011>
- Kawauchi, H., Kawazoe, I., Tsubokawa, M., Kishida, M., Baker, B.I., 1983. Characterization of melanin-concentrating hormone in chum salmon pituitaries. *Nature*.
<https://doi.org/10.1038/305321a0>
- Kessler, B.A., Stanley, E.M., Frederick-Duus, D., Fadel, J., 2011. Age-related loss of orexin/hypocretin neurons. *Neuroscience* 178, 82–88.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.01.031>
- Knezovic, A., Loncar, A., Homolak, J., Smailovic, U., Osmanovic Barilar, J., Ganoci, L., Bozina,

- N., Riederer, P., Salkovic-Petrisic, M., 2017. Rat brain glucose transporter-2, insulin receptor and glial expression are acute targets of intracerebroventricular streptozotocin: risk factors for sporadic Alzheimer's disease? *J. Neural Transm.* 124, 695–708. <https://doi.org/10.1007/s00702-017-1727-6>
- Knezovic, A., Marija, J.O., Patrick, C., 2015. Staging of cognitive deficits and neuropathological and ultrastructural changes in streptozotocin-induced rat model of Alzheimer's disease Morphological changes were manifested as thinning of. *J. Neural Transm.* 122, 577–592. <https://doi.org/10.1007/s00702-015-1394-4>
- Kobayashi, Y., Okada, T., Miki, D., Sekino, Y., Koganezawa, N., Shirao, T., Diniz, G.B., Saito, Y., 2021. Properties of primary cilia in melanin-concentrating hormone receptor 1-bearing hippocampal neurons in vivo and in vitro. *Neurochem. Int.* 142, 104902. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2020.104902>
- Kosse, C., Burdakov, D., 2019a. Natural hypothalamic circuit dynamics underlying object memorization. *Nat. Commun.* 10, 1–8. <https://doi.org/10.1101/603936>
- Kosse, C., Burdakov, D., 2019b. Natural hypothalamic circuit dynamics underlying object memorization. *Nat. Commun.* 10, 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10484-7>
- Kruk-Słomka, M., Budzyńska, B., Biała, G., 2012. Involvement of cholinergic receptors in the different stages of memory measured in the modified elevated plus maze test in mice. *Pharmacol. Reports* 64, 1066–1080. [https://doi.org/10.1016/S1734-1140\(12\)70904-0](https://doi.org/10.1016/S1734-1140(12)70904-0)
- Lagos, P., Torterolo, P., Jantos, H., Chase, M.H., Monti, J.M., 2009. Effects on sleep of melanin-concentrating hormone (MCH) microinjections into the dorsal raphe nucleus. *Brain Res.* 1265, 103–110. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.02.010>
- Lagos, P., Torterolo, P., Jantos, H., Monti, J.M., 2011. Immunoneutralization of melanin-concentrating hormone (MCH) in the dorsal raphe nucleus: effects on sleep and wakefulness. *Brain Res.* 1369, 112–118. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.11.027>
- Lannert, H., Hoyer, S., 1998. Intracerebroventricular administration of streptozotocin causes long-term diminutions in learning and memory abilities and in cerebral energy metabolism in adult rats. *Behav Neurosci* 112, 1199–1208. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.112.5.1199>

- Le Barillier, L., Leger, L., Luppi, P., Fort, P., Malleret, G., Salin, P.-A., 2017. Genetic deletion of Melanin-Concentrating Hormone (MCH) neurons impairs hippocampal short-term synaptic plasticity and hippocampal-dependent forms of short-term memory. *Hippocampus*.
- Lembo, P.M., Grazzini, E., Cao, J., Hubatsch, D. a, Pelletier, M., Hoffert, C., St-Onge, S., Pou, C., Labrecque, J., Groblewski, T., O'Donnell, D., Payza, K., Ahmad, S., Walker, P., 1999. The receptor for the orexigenic peptide melanin-concentrating hormone is a G-protein-coupled receptor. *Nat. Cell Biol.* 1, 267–271. <https://doi.org/10.1038/12978>
- Li, W., Ma, L., Yang, G., Gan, W., 2017. REM sleep selectively prunes and maintains new synapses in development and learning. *Nat. Neurosci.* 20, 427–437. <https://doi.org/10.1038/nn.4479.REM>
- Liguori, C., Chiaravalloti, A., Nuccetelli, M., Izzi, F., Sancesario, G., Cimini, A., Bernardini, S., Schillaci, O., Mercuri, N.B., Fabio, P., 2017. Hypothalamic dysfunction is related to sleep impairment and CSF biomarkers in Alzheimer's disease. *J. Neurol.* 264, 2215–2223. <https://doi.org/10.1007/s00415-017-8613-x>
- Liguori, C., Romigi, A., Nuccetelli, M., Zannino, S., Sancesario, G., Martorana, A., Albanese, M., Mercuri, N.B., Izzi, F., Bernardini, S., Nitti, A., Sancesario, G.M., Sica, F., Marciani, M.G., Placidi, F., 2014. Orexinergic system dysregulation, sleep impairment, and cognitive decline in Alzheimer disease. *JAMA Neurol.* 71, 1498–1505. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2014.2510>
- Lima, F.F.B., Sita, L. V, Oliveira, A.R., Costa, H.C., da Silva, J.M., Mortara, R. a, Haemmerle, C. a S., Xavier, G.F., Canteras, N.S., Bittencourt, J.C., 2013. Hypothalamic melanin-concentrating hormone projections to the septo-hippocampal complex in the rat. *J. Chem. Neuroanat.* 47, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2012.10.003>
- Liu, W., Li, Y., Zhao, T., Gong, M., Wang, X., Zhang, Y., Xu, L., Li, W., Jia, J., 2023. The role of N-methyl-D-aspartate glutamate receptors in Alzheimer's disease: From pathophysiology to therapeutic approaches. *Prog. Neurobiol.* 231, 102534. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2023.102534>
- Liu, Z., Tjian, R., 2018. Visualizing transcription factor dynamics in living cells. *J. Cell Biol.* 217,

1181–1191. <https://doi.org/10.1083/jcb.201710038>

López, X., Richeri, A., Cecilia, M., 2017. Clozapine blockade of MK-801-induced learning / memory impairment in the mEPM : Role of 5-HT 1A receptors and hippocampal BDNF levels. *Physiol. Behav.* 179, 346–352. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.07.016>

Lu, Y., Christian, K., Lu, B., 2008. BDNF: A key regulator for protein synthesis-dependent LTP and long-term memory? *Neurobiol. Learn. Mem.* 89, 312–323. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2007.08.018>

Maletínská, L., Popelová, A., Železná, B., Bencze, M., Kuneš, J., 2019. The impact of anorexigenic peptides in experimental models of Alzheimer’s disease pathology. *J. Endocrinol.* 240, R47–R72. <https://doi.org/10.1530/JOE-18-0532>

Mangano, R.M., Schwarcz, R., 1983. Chronic infusion of endogenous excitatory amino acids into rat striatum and hippocampus. *Brain Res. Bull.* 10, 47–51. [https://doi.org/10.1016/0361-9230\(83\)90073-4](https://doi.org/10.1016/0361-9230(83)90073-4)

McGaugh, J.L., Roozen, B.J.P.G., Roozendaal, B., 2016. Memory modulation. Curated Ref. *Collect. Neurosci. Biobehav. Psychol.* 125, 411–443. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809324-5.21092-4>

Merighi, A., Salio, C., Ferrini, F., Lossi, L., 2011. Neuromodulatory function of neuropeptides in the normal CNS. *J. Chem. Neuroanat.* 42, 276–287. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2011.02.001>

Monzón, M. E., De Barioglio, S.R., 1999. Response to novelty after i.c.v. injection of melanin-concentrating hormone (MCH) in rats. *Physiol. Behav.* 67, 813–817. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(99\)00117-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(99)00117-1)

Monzón, M E, De Barioglio, S.R., 1999. Response to novelty after i.c.v. injection of melanin-concentrating hormone (MCH) in rats. *Physiol. Behav.* 67, 813–817. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(99\)00117-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(99)00117-1)

Monzon, M.E., De Souza, M.M., Izquierdo, L.A., Izquierdo, I., Barros, D.M., De Barioglio, S.R., 1999. Melanin-concentrating hormone (MCH) modifies memory retention in rats. *Peptides* 20, 1517–1519. [https://doi.org/10.1016/S0196-9781\(99\)00164-3](https://doi.org/10.1016/S0196-9781(99)00164-3)

- Mutlu-Burnaz, O., Yulug, B., Oncul, M., Celik, E., Atasoy, N.S., Cankaya, S., Hanoglu, L., Velioglu, H.A., 2022. Chemogenetic inhibition of MCH neurons does not alter memory performance in mice. *Biomed. Pharmacother.* 155, 113771.
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113771>
- Neugebauer, N.M., Miyauchi, M., Sato, T., Tadano, J., Akal, H., Ardehali, H., Meltzer, H.Y., 2018. Hippocampal GABA A antagonism reverses the novel object recognition deficit in sub-chronic phencyclidine-treated rats. *Behav. Brain Res.* 342, 11–18.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.12.033>
- Niño-Rivero, S., Torterolo, P., Lagos, P., 2019. Melanin-concentrating hormone receptor-1 is located in primary cilia of the dorsal raphe neurons. *J. Chem. Neuroanat.* 98, 55–62.
<https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2019.03.003>
- Noble, E.E., Wang, Z., Liu, C.M., Davis, E.A., Suarez, A.N., Stein, L.M., Tsan, L., Terrill, S.J., Hsu, T.M., Jung, A., Raycraft, L.M., Hahn, J.D., Darvas, M., Cortella, A.M., Schier, L.A., Johnson, A.W., Hayes, M.R., Holschneider, D.P., Kanoski, S.E., 2019. Hypothalamus-hippocampus circuitry regulates impulsivity via melanin-concentrating hormone. *Nat. Commun.* 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12895-y>
- Notaras, M., van den Buuse, M., 2019. Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF): Novel Insights into Regulation and Genetic Variation. *Neuroscientist* 25, 434–454.
<https://doi.org/10.1177/1073858418810142>
- Oh, S.T., Liu, Q.F., Jeong, H.J., Lee, S., Samidurai, M., Jo, J., 2019. Nasal Cavity Administration of Melanin-Concentrating Hormone Improves Memory Impairment in Memory-Impaired and Alzheimer ' s Disease Mouse Models. *Mol. Neurobiol.* 1–11.
- Oliveira Santos, T. De, Henrique, C., Mazucanti, Y., Fernando, G., Torrão, S., 2012. Early and late neurodegeneration and memory disruption after intracerebroventricular streptozotocin. *Physiol. Behav.* 107, 401–413.
<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2012.06.019>
- Opitz, B., 2014. Memory function and the hippocampus. *Hippocampus Clin. Neurosci.* 34, 51–59. <https://doi.org/10.1159/000356422>
- Pachoud, B., Adamantidis, A., Ravassard, P., Luppi, P.-H., Grisar, T., Lakaye, B., Salin, P.-A.,

2010. Major impairments of glutamatergic transmission and long-term synaptic plasticity in the hippocampus of mice lacking the melanin-concentrating hormone receptor-1. *J. Neurophysiol.* 104, 1417–25. <https://doi.org/10.1152/jn.01052.2009>
- Park, J.Y., Kim, S.N., Yoo, J., Jang, J., Lee, A., Oh, J.Y., Kim, H., Oh, S.T., Park, S.U., Kim, J., Park, H.J., Jeon, S., 2017. Novel Neuroprotective Effects of Melanin-Concentrating Hormone in Parkinson's Disease. *Mol. Neurobiol.* 54, 7706–7721. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-0258-8>
- Presse, F., Conductier, G., Rovere, C., Nahon, J.-L., 2014. The melanin-concentrating hormone receptors: Neuronal and non-neuronal functions. *Int. J. Obes.* 4, 531–536. <https://doi.org/10.1038/ijosup.2014.9>
- Prince, M., Comas-Herrera, A., Knapp, M., Guerchet, M., Karagiannidou, M., 2016. World Alzheimer Report 2016 Improving healthcare for people living with dementia. Coverage, Quality and costs now and in the future. *Alzheimer's Dis. Int.* 1–140.
- Proescholdt, M.G., Hutto, B., Brady, L.S., Herkenham, M., 1999. Studies of cerebrospinal fluid flow and penetration into brain following lateral ventricle and cisterna magna injections of the tracer [¹⁴C]inulin in rat. *Neuroscience* 95, 577–592. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(99\)00417-0](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(99)00417-0)
- Radiske, A., Rossato, J.I., Gonzalez, M.C., Köhler, C.A., Bevilaqua, L.R., Cammarota, M., 2017. BDNF controls object recognition memory reconsolidation. *Neurobiol. Learn. Mem.* 142, 79–84. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2017.02.018>
- Rai, S., Kamat, P.K., Nath, C., Shukla, R., 2014. Glial activation and post-synaptic neurotoxicity : The key events in Streptozotocin (ICV) induced memory impairment in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 117, 104–117. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2013.11.035>
- Rajagopal, S., Shenoy, S.K., 2018. GPCR Desensitisation. *Physiol. Behav.* 41, 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2017.01.024> GPCR
- Ransick, A., 2004. Detection of mRNA by in situ hybridization and RT-PCR. *Methods Cell Biol.* 2004, 601–620. [https://doi.org/10.1016/s0091-679x\(04\)74024-8](https://doi.org/10.1016/s0091-679x(04)74024-8)

- Ravelli, K.G., Rosário, B. dos A., Camarini, R., Hernandez, M.S., Britto, L.R., 2017. Intracerebroventricular Streptozotocin as a Model of Alzheimer's Disease: Neurochemical and Behavioral Characterization in Mice. *Neurotox. Res.* 31, 327–333. <https://doi.org/10.1007/s12640-016-9684-7>
- Renner, M., Triller, A., 2013. Synaptic Plasticity and the Mechanism of Alzheimer's Disease, Research and Perspectives in Alzheimer's Disease. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Ricciarelli, R., Fedele, E., 2018. cAMP, cGMP and Amyloid β : Three Ideal Partners for Memory Formation. *Trends Neurosci.* xx, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2018.02.001>
- Richmond, M.A., Pouzet, B., Veenman, L., Feldon, J., Yee, B.K., Rawlins, J.N.P., Bannerman, D.M., 1999. Dissociating context and space within the hippocampus: Effects of complete, dorsal, and ventral excitotoxic hippocampal lesions on conditioned freezing and spatial learning. *Behav. Neurosci.* 113, 1189–1203. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.113.6.1189>
- Rivera, P., Guerra-Cantera, S., Vargas, A., Díaz, F., García-Úbeda, R., Tovar, R., Ramírez-López, M.T., Argente, J., de Fonseca, F.R., Suárez, J., Chowen, J.A., 2020. Maternal hypercaloric diet affects factors involved in lipid metabolism and the endogenous cannabinoid systems in the hypothalamus of adult offspring: sex-specific response of astrocytes to palmitic acid and anandamide. *Nutr. Neurosci.* 25, 931–944. <https://doi.org/10.1080/1028415X.2020.1821519>
- Rossato, J.I., Radiske, A., Gonzalez, M.C., Apolinário, G., de Araújo, R.L.S., Bevilaqua, L.R.M., Cammarota, M., 2023. NMDARs control object recognition memory destabilization and reconsolidation. *Brain Res. Bull.* 197, 42–48. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2023.03.013>
- Rossi, M., Choi, S.J., O'Shea, D., Miyoshi, T., Ghatei, M.A., Bloom, S.R., 1997. Melanin-concentrating hormone acutely stimulates feeding, but chronic administration has no effect on body weight. *Endocrinology* 138, 351–355. <https://doi.org/10.1210/en.138.1.351>
- Ruiz-Viroga, V., Urbanavicius, J., Torterolo, P., Lagos, P., 2021. In vivo uptake of a fluorescent

- conjugate of melanin-concentrating hormone in the rat brain. *J. Chem. Neuroanat.* 114, 101959. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2021.101959>
- Saito, Y., Cheng, M., Leslie, F.M., Civelli, O., 2001. Expression of the Melanin-Concentrating Hormone (MCH) Receptor mRNA in the Rat Brain. *J. Comp. Neurol.* 40, 26–40.
- Saito, Y., Nothacker, H., Wang, Z., Lin, S.H.S., Leslie, F., Civelli, O., 1999. Molecular characterization of the melanin-concentrating- hormone receptor. *Nature* 400, 265–269.
- Salio, C., Lossi, L., Ferrini, F., Merighi, A., 2006. Neuropeptides as synaptic transmitters. *Cell Tissue Res.* 326, 583–598. <https://doi.org/10.1007/s00441-006-0268-3>
- Salkovic-Petrisic, M., Knezovic, A., Hoyer, S., Riederer, P., 2013. What have we learned from the streptozotocin-induced animal model of sporadic Alzheimer’s disease, about the therapeutic strategies in Alzheimer’s research. *J. Neural Transm.* 120, 233–252. <https://doi.org/10.1007/s00702-012-0877-9>
- Salkovic-Petrisic, M., Osmanovic, J., Grünblatt, E., Riederer, P., Hoyer, S., 2009. Modeling Sporadic Alzheimer ’ s Disease : The Insulin Resistant Brain State Generates Multiple Long-Term Morphobiological Abnormalities Including Hyperphosphorylated Tau Protein and. *J. Alzheimer’s Dis.* 18, 729–750. <https://doi.org/10.3233/JAD-2009-1184>
- Santos, V., Stark, R., Rial, D., Silva, H., Bayliss, J., Lemus, M., Davies, J., Cunha, R., Prediger, R., Andrews, Z., 2017. Acyl ghrel improves cognition, synaptic plasticity deficits and neuroinflammation following amyloid beta administration in mice. *J. Neuroendocrinol.* <https://doi.org/10.1111/ijlh.12426>
- Saper, C.B., German, D.C., 1987. Hypothalamic pathology in Alzheimer’s disease. *Neurosci. Lett.* 74, 364–370. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(87\)90325-9](https://doi.org/10.1016/0304-3940(87)90325-9)
- Sara, S.J., 2000. Retrieval and Reconsolidation: Toward a Neurobiology of Remembering. *Learn. Mem.* 7, 73–84. <https://doi.org/10.1101/lm.7.2.73>
- Schliebs, R., Arendt, T., 2011. The cholinergic system in aging and neuronal degeneration. *Behav. Brain Res.* 221, 555–563. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.11.058>
- Schmidt, F.M., Kratzsch, J., Gertz, H.-J., Tittmann, M., Jahn, I., Pietsch, U.-C., Kaisers, U.X.,

- Thiery, J., Hegerl, U., Schönknecht, P., 2013. Cerebrospinal Fluid Melanin-Concentrating Hormone (MCH) and Hypocretin-1 (HCRT-1, Orexin-A) in Alzheimer's Disease. *PLoS One* 8, e63136. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063136>
- Schneeberger, M., Tan, K., Nectow, A.R., Parolari, L., Caglar, C., Azevedo, E., Li, Z., Domingos, A., Friedman, J.M., 2018. Functional analysis reveals differential effects of glutamate and MCH neuropeptide in MCH neurons. *Mol. Metab.* 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2018.05.001>
- Schulze, J., Staecker, H., Wedekind, D., Lenarz, T., Warnecke, A., 2022. Expression pattern of brain-derived neurotrophic factor and its associated receptors: Implications for exogenous neurotrophin application. *Hear. Res.* 413, 108098. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2020.108098>
- Shi, H.J., Wang, S., Wang, X.P., Zhang, R.X., Zhu, L.J., 2023. Hippocampus: Molecular, Cellular, and Circuit Features in Anxiety. *Neurosci. Bull.* 39, 1009–1026. <https://doi.org/10.1007/s12264-023-01020-1>
- Shimazaki, T., Yoshimizu, T., Chaki, S., 2006. Melanin-concentrating hormone MCH1 receptor antagonists: A potential new approach to the treatment of depression and anxiety disorders. *CNS Drugs* 20, 801–811. <https://doi.org/10.2165/00023210-200620100-00002>
- Silva-Peña, D., Rivera, P., Alén, F., Vargas, A., Rubio, L., García-Marchena, N., Pavón, F.J., Serrano, A., De Fonseca, F.R., Suárez, J., 2019. Oleoylethanolamide modulates BDNF-ERK signaling and neurogenesis in the hippocampi of rats exposed to δ 9-THC and ethanol binge drinking during adolescence. *Front. Mol. Neurosci.* 12. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2019.00096>
- Silva, D.F., Empadinhas, N., Cardoso, S.M., Esteves, A.R., 2022. Neurodegenerative Microbially-Shaped Diseases: Oxidative Stress Meets Neuroinflammation. *Antioxidants* 11, 1–25. <https://doi.org/10.3390/antiox11112141>
- Syková, E., Nicholson, C., 2008. Diffusion in Brain Extracellular Space. *Physiol. Rev.* 88, 1277–1340. <https://doi.org/10.1152/physrev.00027.2007>
- Tang, S., MacHaalani, R., Waters, K.A., 2010. Immunolocalization of pro- and mature-brain

- derived neurotrophic factor (BDNF) and receptor TrkB in the human brainstem and hippocampus. *Brain Res.* 1354, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.07.051>
- Tetsuka, M., Saito, Y., Imai, K., Doi, H., Maruyama, K., 2004. The basic residues in the membrane-proximal C-terminal tail of the rat melanin-concentrating hormone receptor 1 are required for receptor function. *Endocrinology* 145, 3712–3723. <https://doi.org/10.1210/en.2003-1638>
- Tobin, M.K., Musaraca, K., Disouky, A., Shetti, A., Bheri, A., Honer, W.G., Kim, N., Dawe, R.J., Bennett, D.A., Arfanakis, K., Lazarov, O., 2019. Human Hippocampal Neurogenesis Persists in Aged Adults and Alzheimer’s Disease Patients. *Cell Stem Cell* 24, 974-982.e3. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2019.05.003>
- Tortero, P., Lagos, P., Monti, J.M., 2011. Melanin-concentrating hormone: a new sleep factor? *Front. Neurol.* 2, 14. <https://doi.org/10.3389/fneur.2011.00014>
- Urbanavicius, J., Lagos, P., Tortero, P., Scorza, C., 2014. Prodepressive effect induced by microinjections of MCH into the dorsal raphe. *Behav. Pharmacol.* 25, 316–324. <https://doi.org/10.1097/FBP.0000000000000056>
- Van Den Pol, A.N., Acuna-Goycolea, C., Clark, K.R., Ghosh, P.K., 2004. Physiological properties of hypothalamic MCH neurons identified with selective expression of reporter gene after recombinant virus infection. *Neuron* 42, 635–652. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(04\)00251-X](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(04)00251-X)
- Varas, M., Pérez, M., Ramírez, O., De Barioglio, S.R., 2002. Melanin concentrating hormone increase hippocampal synaptic transmission in the rat. *Peptides* 23, 151–155. [https://doi.org/10.1016/S0196-9781\(01\)00591-5](https://doi.org/10.1016/S0196-9781(01)00591-5)
- Varas, M.M., Pérez, M.F., Ramírez, O. a, de Barioglio, S.R., 2003. Increased susceptibility to LTP generation and changes in NMDA-NR1 and -NR2B subunits mRNA expression in rat hippocampus after MCH administration. *Peptides* 24, 1403–1411. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2003.09.006>
- Villar, M.E., Martinez, M.C., Lopes da Cunha, P., Ballarini, F., Viola, H., 2017. Memory consolidation and expression of object recognition are susceptible to retroactive interference. *Neurobiol. Learn. Mem.* 138, 198–205.

<https://doi.org/10.1016/j.nlm.2016.04.010>

Yap, C.C., Winckler, B., 2015. Adapting for endocytosis: roles for endocytic sorting adaptors in directing neural development. *Front. Cell. Neurosci.* 9, 1–17.

<https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00119>

Zaben, M.J., Gray, W.P., 2013. Neuropeptides and hippocampal neurogenesis.

Neuropeptides 47, 431–438. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2013.10.002>

Zaki, S.R., Nosofsky, R., Jessup, N.M., Unverzagt, F.W., 2003. Categorization and recognition performance of a memory-impaired group : Evidence for single-system models. *J. Int. Neuropsychol. Soc.* 9, 394–406.

Zappa Villar, M.F., López Hanotte, J., Falomir Lockhart, E., Trípodí, L.S., Morel, G.R., Reggiani, P.C., 2018. Intracerebroventricular streptozotocin induces impaired Barnes maze spatial memory and reduces astrocyte branching in the CA1 and CA3 hippocampal regions. *J. Neural Transm.* 0, 0. <https://doi.org/10.1007/s00702-018-1928-7>

Zola-Morgan, S., Squire, L.R., 1993. Neuroanatomy of Memory. *Annu. Rev. Neurosci.* 16, 547–563. <https://doi.org/10.1146/annurev.ne.16.030193.002555>

ANEXOS

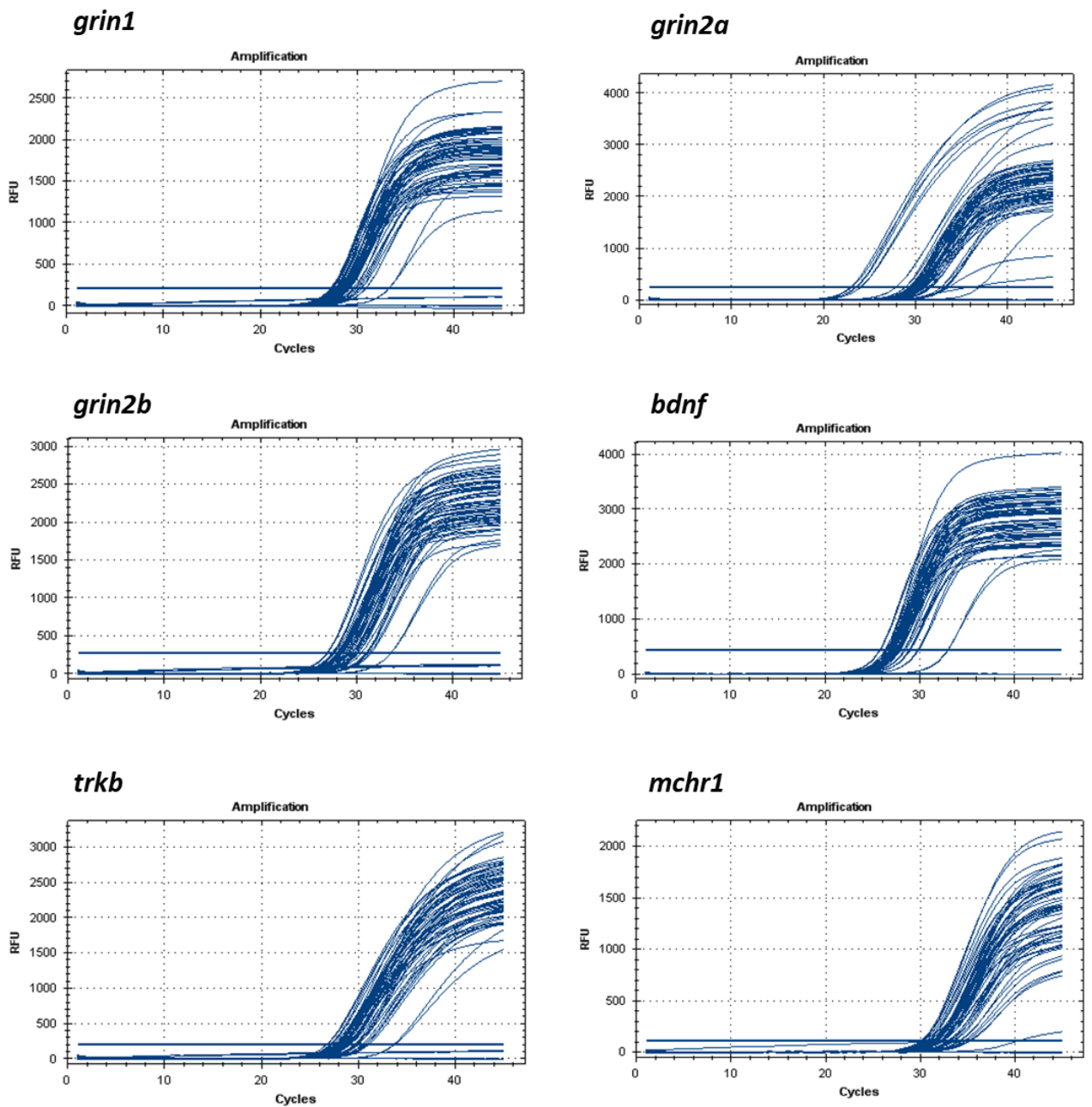


Fig. S1. Curvas de fluorescencia relativa en función del número de ciclos de la qPCR. El ciclado para las PCRs es de 1) 1 ciclo de 2 minutos a 50°C; 2) 1 ciclo de 10 minutos a 95°C; 3) 43 ciclos de 10 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C.

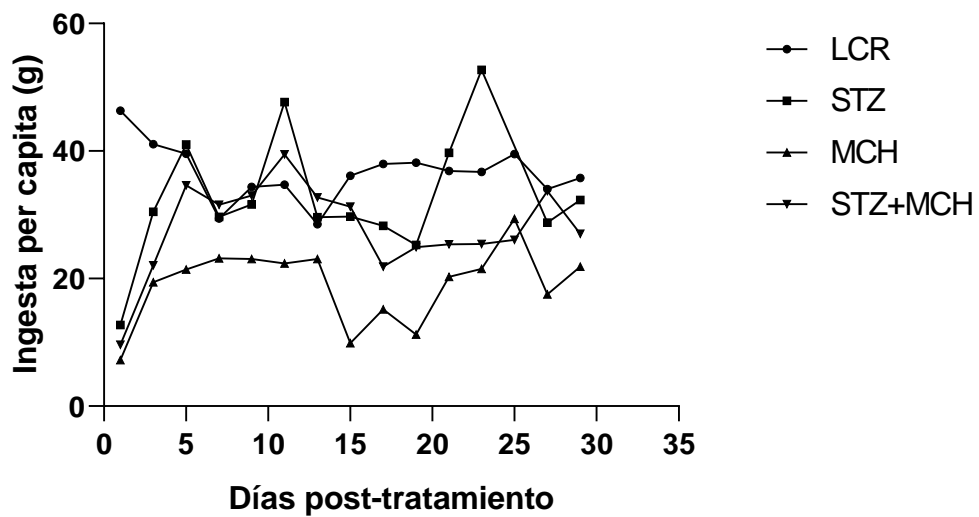


Fig. S2. Variación de la ingesta de alimento durante y luego de tratamiento crónico con MCH. Cada punto representa la media del estimado de ingesta de alimento por rata de cada grupo experimental para cada día post-tratamiento.